

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**Determinación del contenido de antinutrientes en tres variedades
de chocho (Andino INIAP 450, Guaranguito INIAP 451 y Criollo).**

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciado
en Ciencias Químicas con Mención en Química Analítica**

EDGAR ESTEBAN FERNÁNDEZ CHEZA

Quito, 2017

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Químicas, con mención en Química Analítica del Sr. Edgar Esteban Fernández Cheza, ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Mgtr. Gabriela Cueva
Directora de la Disertación
Quito, 20 de Noviembre de 2017

DEDICATORIA

Este trabajo que conlleva el último esfuerzo para obtención del anhelado título universitario, se lo dedico a mis padres y a mi hermana por haber contado con su apoyo en todo momento.

AGRADECIMIENTO

Al Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias-Estación Santa Catalina (INIAP-EESC), y a quienes lo integran, por brindarme la oportunidad de realizar mi Proyecto de Disertación en sus instalaciones, además de otorgarme el financiamiento para el mismo.

A mi directora de tesis, Gabriela Cueva por ayudarme a obtener este tema de tesis muy interesante y que aportara con información valiosa para investigaciones futuras, por su paciencia y apoyarme en la etapa final de mi carrera.

A la Ing. Elena Villacrés por su paciencia, guía, comprensión, por sus consejos oportunos, conocimientos y experiencias.

A mis amigos Nathaly Santorum, Flavia Domenech, Leonardo Bustamante y Leonel Portilla por acompañarme durante la carrera, compartir momentos únicos e inolvidables y brindarme su valiosa amistad.

A mis amigos Hancel Espin, Steve Viteri y Jefferson López por estar siempre en todo momento y sobre todo brindarme su amistad de tantos años.

LISTA DE ABREVIATURAS

INIAP: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias

INIAP-EESC: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias-
Estación Experimental Santa Catalina

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

IDA: Ingesta diaria aceptada

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

OMS: Organización Mundial de la Salud

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

BAPA: Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilina

TIA: Actividad de inhibidores de tripsina

UTI: Unidades de inhibidores de tripsina

SNC: Sistema nervioso central

FL: Fósforo libre

FT: Fósforo total

ADN: Ácido desoxirribonucleico

DCA: Diseño completamente al azar

CV: Coeficiente de variación

DS: Desviación estándar

\bar{X}_m : Promedio

nm: Nanómetros

TABLA DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
TABLA DE CONTENIDOS	viii
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ANEXOS	xii
1 RESUMEN	1
2 ABSTRACT	2
3 INTRODUCCIÓN	3
3.1 CHOCHO (<i>Lupinus mutabilis</i> Sweet)	3
3.1.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA	4
3.1.1.1 COMPOSICIÓN NUTRICIONAL	4
3.1.1.2 ANTINUTRIENTES	5
3.2 DESCRIPCIÓN DE ANTINUTRIENTES.....	6
3.2.1 NITRATOS	6
3.2.2 TANINOS	7
3.2.3 ÁCIDO FÍTICO	8
3.2.4 ALCALOIDES.....	10
3.2.5 INHIBIDORES DE TRIPSINA.....	12
3.2.6 ACTIVIDAD UREASA.....	13
3.3 IMPORTANCIA DE LA DETERMINACIÓN DE ANTINUTRIENTES EN EL CHOCHO	14
3.4 OBJETIVOS	15
3.4.1 OBJETIVO GENERAL.....	15
3.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4 MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1 MATERIALES.....	16

4.1.1 MUESTRA EMPLEADA	16
4.2 MÉTODOS	17
4.2.1 DESAMARAGADO DEL CHOCHO	17
4.2.2 FERMENTADO DEL CHOCHO	18
4.2.3 PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA PARA ANÁLISIS.....	18
4.2.4 NITRATO (MÉTODO ÁCIDO SALICÍLICO, CATALDO, 1975).....	18
4.2.5 TANINOS (MÉTODO A.O.A.C. 952.03 (1964))	19
4.2.6 ALCALOIDES (MÉTODOS DE VON BAER, 1979)	21
4.2.7 ACTIVIDAD UREASA (AACC, MÉTODO 22-90 (2000))	22
4.2.8 ÁCIDO FÍTICO (MÉTODO MEGAZYNE, 2007)	23
4.2.9 INHIBIDORES DE TRIPSINA (KAKADE, 1984; HAMERSTRAND, 1981)	27
4.3 ANÁLISIS DE DATOS	28
5 RESULTADOS	29
5.1 DETERMINACIÓN DE LOS ANTINUTRIENTES	29
5.1.1 NITRATOS	29
5.1.2 TANINOS	31
5.1.3 ALCALOIDES.....	33
5.1.4 ACTIVIDAD UREASA.....	34
5.1.5 ÁCIDO FÍTICO	36
5.1.6 INHIBIDORES DE TRIPSINA.....	37
5.2 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS APLICADOS SOBRE LOS ANTINUTRIENTES EN EL GRANO DE CHOCHO	39
6. DISCUSIÓN	39
6.1 NITRATOS	39
6.2 TANINOS	42
6.3 ALCALOIDES.....	44
6.4 ACTIVIDAD UREASA.....	47
6.5 ÁCIDO FÍTICO	47
6.6 INHIBIDORES DE TRIPSINA.....	51
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	54
7.1 CONCLUSIONES.....	54
7.2 RECOMENDACIONES	55
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	56

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Valores de análisis bromatológico del chocho amargo y desamargado	5
Tabla 2. Información sobre las tres variedades de chocho a ser analizadas ...	17
Tabla 3. Información sobre los factores y niveles en cada factor	28
Tabla 4. Análisis estadístico de varianzas ADEVA.....	28
Tabla 5. Resultados de la concentración de nitratos en las tres variedades de chocho procedentes de los diferentes tratamientos	30
Tabla 6. Resultados de la concentración de taninos en las tres variedades de chocho procedentes de los diferentes tratamientos	32
Tabla 7. Resultados del porcentaje de alcaloides en las tres variedades de chocho procedentes de los diferentes tratamientos.....	34
Tabla 8. Valores de pH de actividad ureasa en las tres variedades de chocho procedentes de los diferentes tratamientos.....	35
Tabla 9. Resultados del contenido de ácido fólico en las tres variedades de chocho procedentes de los diferentes tratamientos.....	36
Tabla 10. Resultados de la concentración de inhibidores de tripsina en las tres variedades de chocho procedentes de los diferentes tratamientos.....	38
Tabla 11. Porcentaje de disminución de la concentración de antinutrientes en las tres variedades de chocho procedentes de los diferentes tratamientos.....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. El chocho (<i>Lupinus mutabilis</i> Sweet).....	3
Figura 2. Estructura química de taninos (Ácido gálico)	7
Figura 3. Estructura química del ácido fítico.....	9
Figura 4. Estructura molecular de la lupanina	11
Figura 5. Curva de calibración para la determinación de nitrato	29
Figura 6. Curva de calibración para la determinación de taninos.....	31

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Preparación de reactivos de la determinación de nitratos	63
Anexo 2. Preparación de reactivos de la determinación de taninos	63
Anexo 3. Preparación de reactivos de la determinación de alcaloides.....	64
Anexo 4. Preparación de reactivos de la determinación de actividad ureasa ..	64
Anexo 5. Preparación de reactivos de la determinación de ácido fítico	65
Anexo 6. Preparación de reactivos de la determinación de inhibidores de tripsina	67
Anexo 7. Resultados obtenidos en los ensayos ejecutados para los antinutrientes en las tres variedades de chocho	68
Anexo 8. Análisis de la varianza y prueba Tukey al 5% para los antinutrientes en las tres variedades de chocho	74

1. RESUMEN

Las semillas de las leguminosas contienen de forma general sustancias denominadas antinutrientes, en el caso del chocho se encuentran algunos de estos compuestos de carácter tóxico o no, que son poco nombrados y al no ser componentes nutritivos no aportan beneficios para la salud o un valor nutricional en la alimentación, sin embargo, al tener distintas propiedades químicas podrían ser empleadas en los campos de medicina, farmacología y en procesos industriales. La cantidad de estos compuestos puede disminuir por lavado o calor, debido a la solubilidad en agua y su termolabilidad. En la presente investigación se determinó el contenido de antinutrientes en tres variedades de chocho (Andino INIAP 450, guaranguito INIAP 451, criollo) en estado amargo o nativo, y en dos diferentes tratamientos (desamargado y fermentado), con el propósito de conocer el tratamiento y la variedad presenta una mayor disminución de estas sustancias. Se evidenció que la variedad Guaranguito 451, en estado amargo presentó el mayor contenido de antinutrientes. En contraste, los procesos aplicados en las tres variedades de chocho redujeron de forma significativa los antinutrientes: nitratos, taninos, alcaloides, ácido fítico, actividad ureasa e inhibidores de tripsina. En base a la reducción de la concentración de antinutrientes se determinó el tratamiento de desamargado como el proceso más directo para eliminar los antinutrientes y, el proceso de fermentado maximizó la reducción de estas sustancias. Existió una disminución de estos compuestos en el proceso de desamargado en el orden de nitratos 93,98 %, taninos 80,69 %, alcaloides 91,96 %, actividad ureasa 89,24 %, ácido fítico en 55,45 % e inhibidores de tripsina en un 71,73 %. Existió una disminución de nitratos en el proceso de fermentado en el orden del 0,47 %, taninos 1,49 %, alcaloides 1,93 %, actividad ureasa 2,05 %, ácido fítico en 16,34 % e inhibidores de tripsina en un 4,95%.

Palabras clave: amargo, antinutrientes, chocho, desamargado, fermentado

2. ABSTRACT

The seeds of legumes generally contain substances called antinutrients, in the case of the lupine there are some of these compounds of a toxic nature or not, because these components are little named and it's not nutritional components do not provide health benefits or nutritional value in the diet, however, it having different chemical properties could be used in the fields of medicine, pharmacology and industrial processes. The amount of these compounds can be reduced by washing or heat, due to the solubility in water and its thermolability. In the present investigation, the antinutrients content was determined in three varieties of lupine (Andino INIAP 450, Guaranguito INIAP 451, Criollo) in bitter or native state, and in two different treatments (remove bitterness and fermented), in order to know the treatment and the variety presents a greater decrease on the substances. The variety Guaranguito 451, in bitter state had the highest content of antinutrients. In contrast, the processes applied in the three varieties of lupine significantly reduced antinutrients: nitrates, tannins, alkaloids, phytic acid, urease activity and trypsin inhibitors. Based on the reduction in the concentration of antinutrients, the remove bitterness was determined as the most direct process to eliminate the antinutrients and the fermentation process maximized the reduction of these substances. There was a decrease of these components in the remove bitterness process in the order of nitrates 93.98 %, tannins 80.69 %, alkaloids 91.96 %, urease activity 89.24 %, phytic acid in 55.45 % and trypsin inhibitors in 71.373 %. There was a decrease of nitrates in the fermentation process in the order of 0.47 %, tannins 1.49 %, alkaloids 1.93 %, urease activity 2.05 %, phytic acid in 16.34 % and trypsin inhibitors in 4.95 %.

Keywords: antinutrients, bitter, remove bitterness, fermented, lupine

3. INTRODUCCIÓN

3.1. CHOCHO (*Lupinus mutabilis* Sweet)

El grano de chocho o tarwi, es una leguminosa originaria de los Andes de Bolivia, Perú y Ecuador (Figura 1), con alto valor nutritivo, por su gran contenido de proteína, (30 a 48%), lo que hace una planta de interés para la nutrición humana y animal. Tiene relevancia en la gastronomía desde la época prehispánica, ha estado presente en sopas, ceviches, ajíes y leches; es un buen sustituto de productos de origen animal. Según especialistas el consumo en diversas presentaciones (cremas, guisos, postres) ayuda a los niños en su crecimiento y desarrollo cerebral, al poseer calcio y aminoácidos. Además tiene características agronómicas como: rusticidad, capacidad de fijar nitrógeno atmosférico a la planta, adaptabilidad a medios ecológicos más secos ubicados entre 2800 y 3600 ms.n.m (Jacobsen & Sherwood, 2002; García, Garzón, Wysocka, Maiztequi, Alzugaray, Del Zotto y Borelli, 2004; INIAP, 2006).



Figura 1. El chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) (INIAP, 2012)

Este género consta de unas 200 especies distribuidas en América, fue conocida desde épocas pre-incaicas, encontrándose en los valles andinos, entre

los 2800 a 3500 msnm. Es cultivada en zonas secas, susceptibles al exceso de humedad y moderadamente susceptibles a la sequía durante la floración y envainado. Para su crecimiento se prefiere suelos francos y franco-arenosos, con balance adecuado de nutrientes, buen drenaje y pH entre 5,5 y 7,0 (INIAP, 2012; Siavichay, 1986).

En Ecuador el cultivo de chocho se localiza en la Sierra, en las provincias de Cotopaxi, Chimborazo, Pichincha, Bolívar, Tungurahua, Carchi e Imbabura. La provincia de Pichincha presenta la mayor superficie de cosecha con 7759 ha., seguida por la provincia de Tungurahua con 6535 ha, (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, 2014).

3.1.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA

3.1.1.1 COMPOSICIÓN NUTRICIONAL

Los ensayos sobre los componentes químicos que posee el grano de *Lupinus mutabilis Sweet* son de mucha importancia por el contenido de proteína y aceite. El grano amargo (con presencia de alcaloides quinolizidinicos) contiene en promedio 42% de proteína; mientras que en el proceso de desamargado, permite concentrar más el contenido de este nutriente, con valores de 51%, en base seca como se muestra en la Tabla 1. El grano también tiene un elevado contenido de aceite (18 a 22%), donde sobresalen los siguientes ácidos grasos: oleico (40%), linoleico (37%) y linolénico (3%) (INIAP, 2006).

Tabla 1. Valores de análisis bromatológico del chocho amargo y desamargado

Componente	Chocho amargo	Chocho desamargado
Proteína (%)	47.80	54.05
Grasa (%)	18.90	21.22
Fibra (%)	11.07	10.37
Cenizas (%)	4.52	2.54
Humedad (%)	10.13	77.05
Alcaloides (%)	3.26	0.03
Azúcares totales (%)	1.95	0.73
Azúcares reductores (%)	0.42	0.61
Almidón total (%)	4.34	2.88
K (%)	1.22	0.02
Mg (%)	0.24	0.07
Ca (%)	0.12	0.48
P (%)	0.60	0.43
Fe (ppm)	78.45	74.25
Zn (ppm)	42.84	63.21
Mn (ppm)	36.72	18.47
Cu (ppm)	12.65	7.99

Fuente: Allauca et al., 2005

3.1.1.2 ANTINUTRIENTES

Las semillas de las leguminosas contienen de forma general sustancias denominadas antinutrientes, en el grano de chocho se encuentran algunas sustancias de este tipo, que pueden ser de carácter tóxico o no; y que pueden desaparecer por lavado o calor ya que la mayor parte de ellas son solubles en agua o termolábiles. Entre las sustancias antinutritivas del chocho se citan: nitratos, taninos, ácido fítico, alcaloides, inhibidores de tripsina y la actividad ureasa (Allauca, 2005), son de naturaleza variada, por lo que reaccionan de distinta manera con las sustancias alimenticias que se ingieran. Son sustancias

generadas por las plantas como modo de defensa ante plagas, pueden ser empleadas en el campo medicinal en el aspecto farmacológico, como potentes antioxidantes, antivirales, anticancerígenos, antimicrobianos, con capacidad quelante, etc. y en el campo industrial se emplea para elaboración de barnices, pinturas, botellas plásticas, entre otras (Rodríguez, 2009).

3.2 DESCRIPCIÓN DE ANTINUTRIENTES

3.2.1 NITRATOS

Los nitratos son compuestos iónicos que se encuentran en la naturaleza formando parte del ciclo del nitrógeno. El nitrato (NO_3^-) es la forma estable de las estructuras oxidadas del nitrógeno, y a pesar de su baja reactividad química puede ser reducido por acción microbiana. El nitrato se forma a partir de la oxidación de nitrito producido por procesos químicos o biológicos (Antón, 2002).

Se encuentran en algunas leguminosas como el chocho, en un alto contenido, debido al uso de fertilizantes. Directamente no es tóxico y es un medio efectivo para prevenir el botulismo al ser usado como aditivo, por su acción antimicrobiana que depende del pH. La mezcla de nitratos con ascorbatos es clave para prevenir el riesgo de botulismo ya que los nitratos actúan como un sistema preventivo (EFSA, 2008).

En forma natural pueden estar presentes en productos cárnicos frescos, productos lácteos, cereales, frutas, bebidas alcohólicas y verduras. En la mayor parte de estos alimentos se encuentran en concentraciones inferiores a 10 mg/Kg y en otros casos exceden los 100 mg/Kg. Sin embargo, las verduras junto con los embutidos aportan mayormente con esta sustancia, los cuales presentan contenidos que oscilan entre 200 y 2500 mg/Kg (Antón, 2002).

La Ingesta Diaria Aceptable (IDA) de nitratos propuesta por el comité conjunto de la FAO/OMS es hasta 3,70 mg/Kg peso corporal; considerando que la toxicidad de los nitratos proviene de la conversión en nitritos, se debe tener en cuenta que la IDA de nitritos es hasta 0,06 mg/kg de peso corporal, para prevenir

la formación previa de nitritos por ingesta excesiva de aquellos alimentos que contienen estas sustancias (EFSA, 2008; FAO/OMS, 2016).

Una utilidad que presentan los nitratos es como bactericida, ya que la combinación de óxido nítrico y el ácido clorhídrico del estómago ataca a ciertas bacterias perjudiciales como la salmonella, la shigella y algunos hongos que generan toxinas (Llorente, 2005).

No hay estudios previos sobre la cantidad correspondiente de nitratos en el chocho, por lo que este estudio, bajo los resultados obtenidos por el método empleado, aportara con este tipo de información.

3.2.2 TANINOS

Son compuestos polifenólicos constituidos por grupos hidroxilo o similares (carboxilo), capaces de formar enlaces con proteínas e inhibir su actividad, pueden formar enlaces cruzados con las proteínas y otras macromoléculas y hacerlas indisponibles para la digestión (Griffith, 1991).

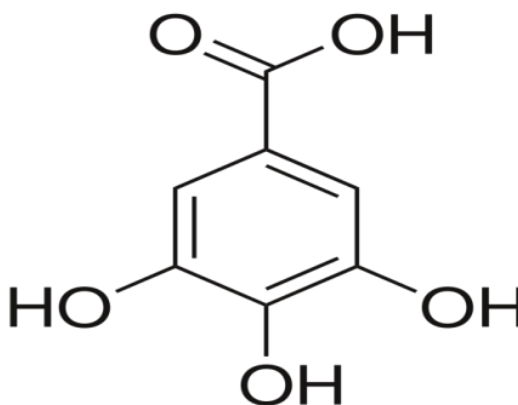


Figura 2. Estructura química de taninos (Acido gálico) (MicroMas, 2012)

Los taninos se clasifican en taninos hidrolizables (gálicos) (ver Figura 2), y taninos condensados (catéquicos o proantocianidinas). Los taninos hidrolizables son compuestos constituidos por un núcleo que contiene un glúcido, que posee grupos hidroxilo que se encuentran esterificados con ácido fenólicos; mientras

que los taninos condensados son polímeros no ramificados de hidroxiflavonoles (flavan-3-ol, flavan 3,4-diol), como la catequina, unidos por enlaces entre carbonos, y que carecen del grupo glúcido (Román et al., 2003).

A los taninos se los considera tóxicos al formar complejos con proteínas, carbohidratos y polímeros de alimentos. Son solubles en agua e insolubles en alcohol y solventes inorgánicos. Tienen la capacidad de inhibir enzimas digestivas y formar complejos con membranas mucosas, generando daños en las mismas (Makkar, 2003).

Los complejos taninos-proteína son insolubles por lo que reducen la digestibilidad proteica, disminuyen la digestibilidad de los nutrientes nitrogenados, causando efectos tóxicos a nivel sistemático y además reduce la biodisponibilidad de vitamina B12, B1 y degrada las reservas de vitamina A (Caballero, 2008).

Por otro lado, a los taninos se los emplea en el campo industrial para el curtido de pieles de animales y la fabricación de barnices y pinturas; tienen actividad antimicrobiana, antifúngica, inhibitoria enzimática, e incluso se usan como antídoto de alcaloides y metales pesados por su capacidad quelante, al atrapar metales de transición u otros metales pesados inhibiendo su absorción en el humano. En el aspecto farmacológico son considerados potentes antioxidantes, antivirales, anticancerígenos y coadyudantes en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (Sánchez, Chávez, Dorveny y Miranda, 2008).

No se tiene estudios previos sobre la cantidad correspondiente de taninos en el chocho, pero como referencia se tienen datos del sorgo donde se ha encontrado valores de $2927 \pm 335,38$ mg/100g (Vázquez, Álvarez, López, Wall-Medrano y De la Rosa, 2012).

3.2.3 ÁCIDO FÍTICO

El ácido fítico o **polifosfato** de **inositol**, es una molécula con seis grupos ortofosfato, de nombre químico mio-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6-hexafosfórico (Figura 3). Además, constituye entre 1 a 3% en peso de semillas de especies

oleaginosas, leguminosas y cereales; además está compuesto por un 60 – 90% de fósforo (Martínez, Gómez y Rincón, 2002).

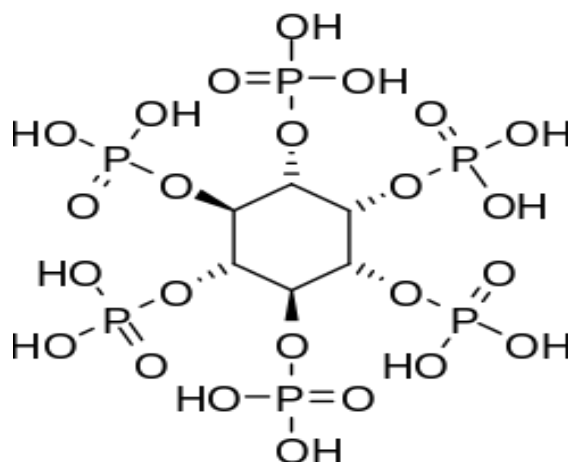


Figura 3. Estructura química del ácido fítico (Novus Nutritio, 2015)

Posee un gran potencial quelante por sus seis grupos fosfato, al tener la capacidad de absorción de compuestos policatiónicos como: Cu^{+2} , Co^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Zn^{+2} . El ácido fítico a pH intermedios y altos forma complejos insolubles con cationes polivalentes que están presentes en el intestino, reduciendo en gran medida la biodisponibilidad nutricional de minerales traza. Además, este ácido en ausencia de cationes de los minerales, a pH bajos se une a los residuos catiónicos de las proteínas y las precipita (Martínez et al., 2002).

El proceso y almacenamiento de alimentos puede generar parcialmente desfosforilado dando lugar a inositoles con un menor número de fosfatos, los cuales presentan una menor capacidad quelante de minerales (Chen, 2004). Este antinutriente tiende a formar complejos insolubles con iones de proteína y de calcio y/o zinc, lo que los hace menos disponibles para su absorción y utilización (Petterson, 2000).

Sin embargo, Zhou & Erdman (1995), indican que el ácido fítico posee diversos beneficios como un agente hipocolesterolémico, para prevenir la formación de cálculos renales y suprimir la oxidación dependiente del hierro. También se sugiere efectos protectores sobre la enfermedad de arterosclerosis, y

el poder antioxidante de este ácido reduce el riesgo de cáncer de colon y la reducción del colesterol total y LDL, lo que supone también un efecto protector de corazón. Sin embargo, no se han realizado experimentos al respecto en humanos (Zhou & Erdman, 1995, y López & Ureña, 2012).

No hay datos sobre la cantidad correspondiente de ácido fítico en el chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*), pero como referencia se tiene que en el Altramuz (*Lupinus luteus*) se ha encontrado este ácido en la cantidad de 0,5 g/100g (García, 2013).

3.2.4 ALCALOIDES

Los alcaloides se encuentran en una proporción de 1-4% cuando el grano es recién cosechado, generan un sabor amargo y pueden ser tóxicos por lo que deben ser eliminados adecuadamente antes del consumo de este grano (Rodríguez, 2009).

La micro química ha permitido mostrar en forma general, que los alcaloides están localizados en los tejidos periféricos de los diferentes órganos de la planta, es decir en el recubrimiento de las semillas, corteza del tallo, raíz o fruto y en la epidermis de la hoja; por lo que nos permite entender que los alcaloides cumplen una importante función de proteger la planta, por su sabor amargo hacia el ataque de insectos (Brutenon, 1991; Wink, 1992).

Estos alcaloides son de tipo quinolizidinicos, tienen un heterociclo nitrogenado bicíclico, conocido como quinolizidina, y además tienen un carácter básico. Las quinolizidinas auténticas son aquellas que se derivan de la lisina y se pueden dividir en bicíclicas como la lupanina, tricíclicas como la cisticina o tetracíclicas como la esparteína. Los alcaloides presentes en el chocho son los siguientes: lupanina, esparteína, 4-hidroxilupanina, isolupanina, n-metilangustifolina, 13-hidroxilupanina (Rodríguez, 2009).

Estos compuestos tienen propiedades alcalinas debido a la presencia de nitrógeno básico formado por lo general núcleos heterocíclicos. Estos en forma libre son insolubles en agua, poco solubles en alcohol y solubles en éter y cloroformo, la mayoría posee oxígeno en su estructura y son sólidos no volátiles, sin embargo no todos son sólidos debido a que no poseen oxígeno como la esparteína, siendo esta líquida a temperatura ambiente (Arias, 1985; Jarrín, 2003).

La lupanina es el alcaloide que se encuentra en mayor concentración en el chocho, su fórmula molecular $C_{15}H_{24}N_2O$ (ver Figura 4), tiene un peso molecular de 248,36 g/mol, es soluble en agua, cloroformo y alcohol e insoluble en éter de petróleo (Rodríguez, 2009).

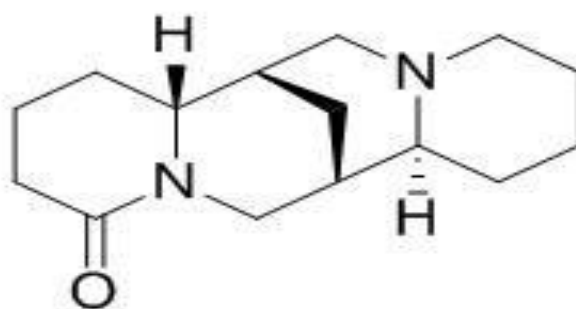


Figura 4. Estructura molecular de la lupanina (Rodríguez, 2009)

Por lo general estas sustancias se pueden extraer utilizando soluciones de ácidos en agua, logrando eliminar la mayor parte de ellos, dejando un residuo del 0.03% de todos los alcaloides presentes en la semilla y también sus sales respectivas (Villacrés, Peralta, Cuadrado, Revelo, Abdo y Aldaz, 2009).

La toxicidad de estos compuestos ha sido demostrada a dosis muy altas tanto en animales como en seres humanos, con cantidades comprendidas entre 11 a 25 mg/Kg peso corporal en niños y dosis de 24 a 46 mg/Kg de peso corporal en adultos (Campana, 1988; Jarrín, 2003).

A pesar que los alcaloides dan el sabor amargo al chocho, tienen usos en beneficio de la agricultura y la salud; estos se emplean para controlar ectoparásitos y parásitos intestinales de los animales, además el producto líquido del desamargado se lo ha utilizado por agricultores como laxante y para el control de plagas en plantas (Gavilanes, 2003). En el campo industrial se los emplea para la elaboración de polímeros ópticamente activos, como catalizador de la polimerización del etileno, en la generación de un polímero conocido para la manufactura de bolsas de plástico, botellas, embalajes, etc. (Guerrero, 1987; Daub & Seese, 1996).

En el presente el uso de alcaloides se emplea en estudios “in vitro” con actividad antibacteriana para combatir la actividad de cepas de carácter nocivo como: *Escherichia coli* (9637), *Salmonella gallinarum* (9184), *Pseudomona aeruginosa* (27853) entre otras. Además se usa en la actividad fungistática empleadas en frutas de interés económico para retardar el desarrollo y la multiplicación del *Penicillium digitatum* (hongo) para evitar el deterioro de las características organolépticas de las frutas. Finalmente se lo usa en la actividad nematocida ya que el nemato reduce significativamente los rendimientos de vida útil de la planta, ya que permite la entrada de otros agentes patógenos como hongos y bacterias a través de las lesiones que causa a las raíces, el empleo de alcaloides ayudan a la mortalidad del 99,3 y 96,7 % de larvas expuestas, respectivamente (INIAP, 2009).

3.2.5 INHIBIDORES DE TRIPSINA

La tripsina al ser una proteasa, permite la hidrolización de proteínas a aminoácidos, los cuales son absorbidos por el organismo humano. Los inhibidores de esta proteasa se pueden encontrar en mayor proporción en leguminosas y cereales, por ejemplo en la semilla del chocho. Los inhibidores de tripsina pueden coexistir en la misma planta con otros inhibidores proteolíticos, (Valle & Florentino, 2000). Estos inhibidores enzimáticos impiden la proteólisis digestiva (descomposición de las proteínas en aminoácidos), lo que puede causar

problemas al sistema inmune o al riñón, incluso pueden originar problemas de crecimiento, debido a la baja absorción de proteínas. Normalmente se descompone con el calor, desnaturalizando su efecto inhibidor aunque suele quedar un valor residual inhibidor del 5-20% (Cruz, 2013). Sin embargo, si se trata de destruirlas completamente, las condiciones para ello son bastante drásticas, ocasionando la degradación de componentes nutritivos (Valle & Florentino, 2000).

Cabe mencionar que desde el punto de vista farmacológico, los inhibidores de tripsina se los han utilizado como agentes quimiopreventivos de cáncer, eficaces como agentes anticancerígenos en concentraciones molares extremadamente bajas, mientras que la mayoría de los agentes anticancerígenos son eficaces solo a niveles muy altos (García, 2013).

En estudios previos se ha encontrado la cantidad correspondiente de inhibidores de tripsina en el chocho, en la especie altramuza (*Lupinus luteus*), según García en un estudio realizado en 2013 se encontró que los inhibidores de tripsina en el altramuza alcanzan valores de 1,3 UIT/mg (García, 2013).

3.2.6 ACTIVIDAD UREÁSICA

La urea es uno de los fertilizantes nitrogenados de síntesis más utilizados, debido a su alta concentración y la facilidad de uso en el cultivo de alimentos vegetales como en el caso del chocho. La urea se descompone en amoníaco y dióxido de carbono al ser catalizada por la ureasa, el nivel de actividad de la ureasa es de suma importancia en relación con los efectos adversos de la urea. Es así que la actividad ureasa se define como la suma de la actividad de cada una de las fuentes detectables capaces de hidrolizar urea (Borie y Fuentealba, 1982).

De acuerdo a Pérez, en un estudio realizado en 2007 esta actividad ureasa se la utilizó en tratamiento de aguas residuales con alto contenido en nitrógeno orgánico, donde se obtuvo resultados exitosos en la degradación del nitrógeno orgánico con una eficiencia superior al 90% al cabo de 5 días (Pérez, Niño y Hernández, 2007).

No se tiene estudios previos sobre la cantidad correspondiente de actividad ureasa en el chocho, pero según la FAO se establece que si un alimento presenta valores de 0,05 a 0,30 unidades de pH, indica que el alimento ha recibido un procesamiento adecuado y puede ser utilizado con seguridad (FAO, 2017).

3.3 IMPORTANCIA DE LA DETERMINACIÓN DE ANTINUTRIENTES EN EL CHOCHO

A nivel nutricional, la determinación de compuestos antinutricionales es necesaria para garantizar que los alimentos en estado nativo y procesado, puedan ser consumidos sin provocar alteraciones al organismo humano. Éstos son poco nombrados al no ser elementos nutritivos y que supuestamente no aportan beneficio para la salud o valor adicional a nuestra alimentación. Sin embargo, al ser sustancias de naturaleza muy diversa pueden tener distintas propiedades químicas y físicas, y pueden ser enfocadas a otros campos como el medicinal, farmacológico y agroindustrial (Mazza, 2000).

Los antinutrientes que se obtienen del chocho presentan diversos beneficios en el cuerpo humano, ayudando a contrarrestar enfermedades como: cáncer de colon, cálculos renales, disminución del índice glicémico, reducción de los niveles de azúcar en sangre, gracias a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, analgésicas, antimicrobianas, etc., y se puede usar como bioinsecticida entre otros usos (Sánchez, 2008).

Dependiendo del tratamiento previo que se le da al chocho antes de su consumo, se va a determinar la cantidad de antinutrientes existentes, así por ejemplo el chocho recién cosechado tiene alto contenido de alcaloides y no se consume directamente por su sabor amargo y dureza del grano. En el grano desamargado no es perceptible el sabor amargo, sin embargo se debe cuantificar su contenido de antinutrientes con el fin de establecer niveles seguros para el consumo. El chocho fermentado presenta un sabor agradable y característico a carne, y una mejor textura deseable para el consumo de niños y ancianos; sin

embargo se debe analizar los antinutrientes para verificar su presencia en el chocho para asegurar la calidad e inocuidad del producto (INIAP, 2006).

De esta manera, el análisis de la concentración de antinutrientes en tres variedades de chocho (andino INIAP 450, guaranguito INIAP 451, criollo), de mayor consumo y comercialización en Ecuador; en tres tratamientos (amargo, desamargado y fermentado), proveerá de datos necesarios para evaluar el aporte antinutricional para conocer que tratamiento y variedad presenta menor presencia de estas sustancias.

3.4 OBJETIVOS

3.4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el contenido de antinutrientes en tres variedades de chocho (andino INIAP 450, guaranguito INIAP 451, criollo), en estado nativo (amargo), y en dos tipos de tratamiento: desamargado y fermentado; y así identificar el proceso con el cual se logra una disminución importante de los compuestos antinutricionales.

3.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Cuantificar el contenido de nitratos, taninos, ácido fítico, alcaloides, actividad ureásica e inhibidores de tripsina en las muestras de chocho procedentes de los diferentes tratamientos.

Establecer el tratamiento con el que se logra la mayor disminución de la concentración de antinutrientes en cada variedad de chocho.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 MUESTRA EMPLEADA

En el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias-Estación Experimental Santa Catalina (INIAP-EESC), se cultivan algunas variedades de chocho entre las cuales están: Andino INIAP 450, Guaranguito INIAP 451 y Criollo, que son del género *Lupinus mutabilis* Sweet, como se ve en la Tabla 2. Las variedades andino INIAP 450 e guaranguito INIAP 451 son de origen externo (Perú), cultivado en el país y han sido mejoradas en los parámetros rendimiento, precocidad y resistencia a enfermedades (Caicedo, Murillo, Pinzón, Peralta & Rivera, 2010; INIAP, 2010).

El INIAP-EESC cuenta con un Programa de Mejoramiento de las variedades de chocho y otras leguminosas, el cual proporcione presentaciones de 10 Kg de cada una de las muestras, de esta se realizó un cuarteo obteniendo una sub-muestra de 2 Kg para los posteriores análisis. De esta sub-muestra se tomó la masa respectiva para las diferentes determinaciones.

Tabla 2. Información sobre las tres variedades de chocho a ser analizadas

Variedad	Hábito	Días floración	Días cosecha	Color grano	Peso 100 semillas (g)	Rendimiento promedio (kg/ha)	Altitud óptima (msnm)
INIAP Andino 450	Herbácea basal erecta	100	200	Crema	30	1350	2600 - 3400
INIAP 451 Guaranguito	Herbácea basal erecta	80	171	Blanco	28	1398	2200- 3600
Criollo	Herbácea basal erecta	110	300	Blanco	27	1400	2600- 3700

Fuente: INIAP

4.2 MÉTODOS

4.2.1 DESAMARGADO DEL CHOCHO

El proceso de desamargado se obtuvo a través de un proceso térmico-hídrico, que consiste en dejar el grano en remojo acuoso por 10 horas a una temperatura inicial de 92 °C, luego el grano es cocido en agua por 60 minutos, con un cambio de agua de 30 minutos. Finalmente se realiza un lavado por 72 horas con agua potable con agitación y a una temperatura constante de 20 °C (INIAP, 2001).

4.2.2 FERMENTADO DEL CHOCHO

El proceso de fermentación sólida del chocho consiste en ajustar la humedad del grano desamargado a 60 %, luego se esteriliza, se enfría y se inocula una suspensión de esporas del hongo del género *Rhizopus oligosporus*. Se incubó el conjunto a una temperatura de 29-30 °C durante 3 días, cuando se observa la multiplicación de micelios, el cual es detenido por pasteurización o secado de las muestras por liofilización (INIAP, 2006).

4.2.3. PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA ANÁLISIS

Para los análisis de los antinutrientes, previamente se molieron las muestras obtenidas de los procesos de desamargado y fermentado, donde se tamizó a través de una malla N° 40 con un diámetro de poro de 0,422 mm, obteniendo una harina de chocho, donde se tomó la masa respectiva para las diferentes determinaciones.

4.2.4. NITRATOS (MÉTODO ÁCIDO SALICÍLICO, CATALDO et al., 1975)

La determinación de nitratos se realizará por colorimetría empleando el método de ácido salicílico, el cual consiste en realizar una extracción acuosa de la muestra para luego con la ayuda del ácido generar el complejo coloreado que se medirá a una longitud de onda de 410 nm (Cataldo, Maroon, Schrader y Youngs, 1975).

Se pesó 2,5 g de muestra molida y tamizada en un erlenmeyer y se añadió 10 mL de solución extractora (K_2SO_4 , 0.34M). Seguidamente se agitó por 10 min en un Mistral Multi-Mixer y se centrifugó en una centrifugadora International Centrifuge, por un lapso de 10 min a 350 revoluciones por minuto. A continuación se filtró utilizando un papel filtro Whatman 1.

Luego se colocó 0.5 mL del filtrado en un vaso de precipitación de 50 mL, y se añadió 1mL de ácido salicílico al 5% y se mezcló. Después se dejó reposar 5

min y se añadió 10 mL de NaOH 4N, mezclando vigorosamente. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se leyó en el espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 201, a una longitud de onda de 410 nm, con el software INSIGHT.

La preparación de reactivos se detalla en el Anexo 1.

4.2.4.1 CURVA DE CALIBRACIÓN

Se prepararon soluciones de 10 mL a partir de la solución estándar de 20 ppm de N-NO_3^- , en las siguientes concentraciones: 2, 4, 6, 8 y 10 ppm, en K_2SO_4 0.34 M. Para formar el complejo coloreado, se colocó 0.5 mL de cada estándar en un vaso de precipitación de 50 mL y se añadió 1 mL de ácido salicílico al 5% y se mezcló. Después se dejó reposar y agregó 10 mL de NaOH 4 N. Posteriormente se leyó en el espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 201, a una longitud de onda de 410 nm.

4.2.4.2 CÁLCULOS

Se debe tener en consideración para los cálculos las diluciones realizadas y el peso de la muestra. Los nitratos se expresan con la siguiente formula:

$$\frac{\text{mg nitratos}}{100\text{g muestra}} = \left[\frac{C.\text{final} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right)}{C.\text{inicial} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right)} \times 100 \right] \times 1000 \quad (4.1)$$

Donde:

C.final= Lectura en mg/L

C.inicial= En mg/L

4.2.5 TANINOS (MÉTODO A.O.A.C. 952.03 (1964))

El método utilizado fue adaptado y modificado en los laboratorios del departamento de Nutrición y Calidad de la Estación Experimental Santa Catalina- INIAP.

La determinación de este antinutriente se realiza en una muestra libre de grasa y pigmentos, utilizándose un extracto acuoso el cual reacciona con el reactivo Folin-Denis en medio alcalino. Se utilizará ácido tánico como estándar y se realizará las lecturas en un espectrofotómetro UV-Vis a 680 nm (A.O.A.C. 952.03, 1964).

Se pesó 1 gramo de muestra molida y tamizada en una canasta de papel filtro y se extrajo la grasa durante 8 horas con hexano grado técnico. Luego se colocó en ebullición el residuo durante 1 hora con 100 mL de agua destilada. Después se dejó enfriar, se filtró y se aforó a 100 mL. Se tomó una alícuota de 5 mL del filtrado en balones de 100 mL, se añadió 2 mL de reactivo Folin-Denis, 5 mL de solución de carbonato de sodio saturado y se aforó a 100 mL con agua destilada. Se dejó 30 minutos que ocurra la reacción y se leyó en el espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 201, a una longitud de onda de 680 nm.

La preparación de reactivos ver en Anexo 2.

4.2.5.1 CURVA DE CALIBRACIÓN

Se prepararon soluciones de 10 mL a partir de la solución madre de 100 ppm de ácido tánico en las siguientes concentraciones: 1, 2, 3, 4 y 5 ppm. Para formar el complejo coloreado se colocó 0.4 mL de reactivo Folin-Denis y 1 mL de carbonato de sodio saturado a cada estándar y se aforó hasta 10 mL con agua destilada. Posteriormente se leyó en el espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 201, a una longitud de onda de 680 nm.

4.2.5.2 CÁLCULOS

Se debe tener en consideración para los cálculos las diluciones realizadas y el peso de la muestra. Los taninos vienen expresados como ácido tánico y los resultados se expresan en base a la siguiente formula:

$$\frac{mg \text{ taninos}}{g \text{ muestra}} = \left(\frac{LR \times V \times FD}{Pm} \right) \quad (4.2)$$

Donde:

LR= Lectura de regresión (mg/L)

V= Volumen final (mL)

FD= Factor de dilución

Pm= Peso de la muestra (g)

4.2.6 ALCALOIDES (MÉTODO DE VON BAER, 1979)

La determinación de alcaloides en chocho se efectuará por volumetría, donde se transforma los alcaloides en sus bases, para luego el material resultante se seca con óxido básico de aluminio, para extraerlos con cloroformo y titularlos con ácido sulfúrico e hidróxido de sodio empleando rojo de metilo como indicador, el contenido de alcaloides se reporta como contenido de lupanina (Von Baer, 1979).

Se pesó 0.2 g de muestra molida y tamizada en un tubo cónico de centrifuga. A continuación, se agregó 0.6 g de óxido de aluminio y se añadió 0.2 mL de KOH al 15%, se mezcló bien hasta tener una pasta homogénea. Seguidamente se agregó 6 mL de cloroformo y se centrifugó por 10 minutos en una centrifugadora International Centrifuge a 350 revoluciones por minuto. Luego se recibió la fase clorofórmica en vasos de precipitación de 50 mL, provistos de embudos con algodón en la base del cono. Se repitió las extracciones aproximadamente 10 veces, se recogió los lavados y se evaporó con calor suave (40°C) sin llegar a sequedad, dejando en la etapa final 1 mL. Después, de que haya desaparecido el 1 mL de los lavados, se agregó 5 mL de H₂SO₄ 0.01 N y dos gotas de rojo de metilo, se tituló el exceso de ácido con NaOH 0.01 N.

La preparación de reactivos se detalla en el Anexo 3.

4.2.6.1 CÁLCULOS

El contenido de alcaloides se reporta como lupanina. Se emplea la siguiente formula:

$$\% \text{ Alcaloides} = \frac{mL \text{ NaOH } 0.01N \times 0.01N \times 248g}{Pm} \quad (4.3)$$

Donde:

mL NaOH= Volumen gastado de titulante

0.01N= Concentración exacta de NaOH

248g= Peso molecular de la lupanina

Pm= Peso de muestra (g)

4.2.7 ACTIVIDAD UREÁSICA (AACC, MÉTODO 22-90, (2000))

La determinación de actividad ureasa residual se lo realizará por diferencia de pH entre la muestra y el blanco, ya que el incremento de pH corresponde a la actividad ureasa (AACC, método 22-90, 2000).

Se pesó 0.2 gramos de muestra molida y tamizada en un tubo de ensayo, luego se añadió 10 mL de solución de urea y se mezcló bien. A continuación, se preparó el blanco pesando 0.2 gramos de muestra en un tubo de ensayo, seguidamente se añadió 10 mL de la solución de buffer fosfato 0.05 M. Luego se colocaron los dos tubos (blanco y muestra) en un baño maría Sybron, a 30 °C, se agitaron manualmente cada 5 min durante el periodo de digestión y se retiró los tubos del baño al cabo de 30 minutos. Luego se determinó el pH a través de un pH metro Inolab, de los sobrenadantes, a los 5 min de haber retirado los tubos del baño maría.

La preparación de reactivos se describe en el Anexo 4.

4.2.7.1 CÁLCULOS

El resultado está dado en unidades de pH proporcionales a la actividad ureasa. Se registra el diferencial de pH entre la muestra y el blanco. El incremento del pH corresponde al incremento de la actividad ureasa en base a la siguiente formula:

$$IAU = pH \text{ tubo A} - pH \text{ tubo B} \quad (4.4)$$

Donde:

Tubo A= (muestra + buffer urea)

Tubo B= (blanco + buffer fosfato)

4.2.8 ÁCIDO FÍTICO (MÉTODO MEGAZYNE, 2007)

El ácido fítico se determinará a través de la desfosforilación del ácido fítico efectuado por las enzimas fitasas obteniendo fósforo libre y total, el cual se cuantificará por las lecturas en un espectrofotómetro UV-Vis a 655 nm (Megazyne, 2007).

Se pesó 1 g de muestra molida y tamizada en un erlenmeyer de 50 mL y se añadió 20 mL de ácido clorhídrico 0.66 M, se cubrió con papel aluminio y se lo dejó en agitación por toda la noche. Después se trasvasó 1 mL de solución a un tubo de centrifuga y se centrifugó en una centrifuga (International Centrifuge), por 10 min a 350 revoluciones por minuto. A continuación se transfirió 0.5 mL de sobrenadante del extracto resultante a un nuevo tubo de centrifuga y se neutralizó con adición de 0.5 mL de NaOH 0.75 M.

Para la determinación de fósforo libre, se colocó en un tubo de centrifuga 0.62 mL de agua destilada; 0.20 mL de solución 1; 0.05 mL del extracto de la muestra neutralizada. Después se mezcló en un vortex Genie 2 y se incubó durante 10 min a 40 °C en un baño maría Sybron. A continuación se añadió en el mismo tubo 0.02 mL de agua destilada; 0.20 mL de solución 2; se mezcló en un vortex Genie 2 y se incubó durante 15 min a 40 °C en un baño maría Sybron.

Luego se añadió 0.30 mL de ácido tricloroacético y se centrifugó en una centrifugadora International Centrifuge durante 10 min a 350 revoluciones por minuto. El sobrenadante se empleó en la determinación colorimétrica.

Para la determinación de fósforo total, se colocó en un tubo de centrifuga 0.60 mL de agua destilada; 0.20 mL de solución 1; 0.05 mL del extracto de la muestra neutralizada; 0.02 mL de suspensión 2. Después se mezcló en un vortex y se incubó durante 10 min a 40 °C en un baño maría. A continuación se añadió en el mismo tubo 0.20 mL de solución 2 y 0.02 mL de suspensión 4; se mezcló en un vortex y se incubó durante 15 min a 40 °C en un baño maría. Luego se añadió 0.30 mL de ácido tricloroacético y se centrifugó en una centrifugadora durante 10 min a 350 revoluciones por minuto. El sobrenadante se empleó en la determinación colorimétrica.

Para la determinación colorimétrica de fósforo, se pasó 1 mL del sobrenadante a un tubo de centrifuga, 1 mL de muestra y se añadió 0.5 mL de reactivo de color o solución AB. A continuación se mezcló en un vortex y se incubó durante 1 hora a 40 °C en un baño maría. Posteriormente se dejó reposar por 30 minutos y se leyó en el espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 201, a una longitud de onda de 655 nm.

4.2.8.1 SOLUCIONES ESTÁNDAR

Se prepararon soluciones de 10 mL a partir de la solución madre de 50 ppm de solución estándar de fósforo en las siguientes concentraciones: 0,0 0.5, 2.5, 5.0 y 7.5 ppm. Para formar el complejo coloreado, se colocó 1 mL de cada estándar en tubos de centrifuga y se añadió 0.5 mL de reactivo de color o solución AB. A continuación se mezcló en un vortex Genie 2 y se incubó durante 1 hora a 40 °C en un baño maría Sybron. Posteriormente se dejó reposar por 30 minutos y se leyó en el espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 201, a una longitud de onda de 655 nm.

La preparación de reactivos se describe en el Anexo 5.

4.2.8.2 CÁLCULOS

A) Curva de calibración de fósforo

A.1. Se determina la absorbancia de cada estándar restando la absorbancia del blanco de las absorbancias de los estándares (STD 1-4), de este modo se obtiene $\Delta A_{fósforo}$.

A.2. Cálculo del valor M para cada estándar (STD 1-4)

$$M = \frac{P(\mu g)}{\Delta A_{fósforo}} \quad (4.5.1)$$

Donde:

P= Concentración de fósforo en μg

$\Delta A_{fósforo}$ = Diferencia de absorbancias del fósforo

A.3. Cálculo del valor M promedio

$$M_{promedio} = \frac{(MSTD1 + MSTD2 + MSTD3 + MSTD4)}{4} \quad (4.5.2)$$

El valor de M promedio se utiliza para calcular el contenido de fósforo en las muestras como se indica en la sección B.

B) Fósforo/Contenido de ácido fítico

Determinar la absorbancia (A_{655}) de las dos muestras; la muestra para determinar “Fósforo Libre (FL)” y la muestra para determinar “Fósforo Total (FT)”. Restar la absorbancia de la muestra de FL de la absorbancia de la muestra de FT, para obtener $\Delta A_{fósforo}$.

La concentración de fósforo se puede calcular con la siguiente formula:

$$C \left(\frac{g}{100g} \right) = \left(\frac{M_{promedio} \times 20 \times F}{10000 \times 1,0 \times v} \right) \times \Delta A_{fósforo} \quad (4.5.3)$$

Donde:

C= Concentración de fósforo (g/100g)

M promedio= Valor promedio de los estándares de fósforo

20= Volumen de la muestra extraída originalmente (mL)

F= Factor de dilución

ΔA = Diferencia de absorbancia de las muestras

10000= Conversión de $\mu\text{g/g}$ a g/100g

1,0= Peso de la muestra original (g)

V= Volumen de la muestra (empleada en la determinación colorimétrica)

El cálculo simplificado:

$$C \left(\frac{g}{100g} \right) = \left(\frac{M_{promedio} \times 20 \times 55,6}{10000 \times 1,0 \times 1,0} \right) \times \Delta A_{fósforo} \quad (4.5.3.1)$$

$$C \left(\frac{g}{100g} \right) = M_{promedio} \times 0,1112 \times \Delta A_{fósforo} \quad (4.5.3.2)$$

B.1 Para obtener la concentración de ácido fítico se emplea la siguiente fórmula:

$$CAF \left(\frac{g}{100g} \right) = \frac{C}{0,282} \quad (4.5.4)$$

Donde:

CAF= Concentración de ácido fítico (g/100g)

C= Concentración de fósforo (g/100g)

0,282= Contenido de fósforo asociado únicamente a la concentración de ácido fítico, el cual corresponde al 28,2% del ácido fítico.

4.2.9 INHIBIDORES DE TRIPSINA (KAKADE, 1984; HAMERSTRAND et al., 1981)

La determinación de este antinutriente se lo hará por colorimetría, donde la enzima exógena tripsina es parcialmente atacada por los inhibidores presentes en el extracto de la muestra. La tripsina restante actúa sobre la solución sustrato de BAPA (benzoil-DL-arginina-p-nitroanilina), dando un complejo coloreado que se lee a 410 nm (Kakade, 1984).

Se pesó 1 gramo de muestra desengrasada en un erlenmeyer de 50 mL y se adicionó 50 mL de NaOH 0,01N (el pH ajustado requerido de 8,4-10,0), se cubrió con papel aluminio y se agitó mecánicamente por 3 horas. Después, las siguientes adiciones se pipetearon en una serie de tubos de 10 mL: a) estándar de tripsina: 2 mL de la solución de tripsina, 2 mL agua destilada; b) blanco de muestra: 2 mL del extracto de muestra; c) muestra: 2 mL del extracto de muestra, 2 mL solución estándar de tripsina. Luego los tubos se colocaron en un baño maría Sybron y se incubaron durante 10 min a 37 °C. Seguidamente se añadió 5 mL de solución de BAPA (previamente calentada a 37 °C), y se incubó a 37°C por 10 min. Terminada la incubación se añadió 1 mL de ácido acético 30% v/v y se mezcló en un vortex Genie 2. Adicionalmente se agregó 2 mL de estándar de tripsina al blanco de muestra (b). Se filtraron y posteriormente la absorbancia de cada solución se determinó a 410 nm frente a la muestra de blanco, en un espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 201.

La preparación de reactivos se detalla en el Anexo 6.

4.2.9.1 CÁLCULOS

Los valores obtenidos del extracto de muestra se restó del patrón de tripsina, el contenido de inhibidor de tripsina se determinó a partir de la siguiente fórmula:

$$TI, \frac{mg}{g} \text{ de muestra} = \frac{AI}{0,019 \times 1000} \times FD \quad (4.6)$$

Donde:

AI: Diferencia de absorbancias entre la absorbancia del estándar y de la muestra

0,019: 1 ug de tripsina pura tiene una actividad equivalente de 0,019 unidades de absorbancia

FD: Factor de dilución

4.3 ANÁLISIS DE DATOS

Los datos obtenidos se analizaron aplicando un diseño completamente al azar (DCA) en arreglo factorial 2x3, en el que se trabajó con dos factores y 3 niveles en cada factor. Se realizaron 3 repeticiones de los análisis en cada variedad de chocho. El análisis estadístico de varianzas ADEVA, se plantea según lo indicado en la Tabla 3.

Tabla 3: Información sobre los factores y niveles en cada factor

Factor		Nivel	Descripción
A	Variedad de grano	a ₁	INIAP Andino-450
		a ₂	INIAP Guaranguito-451
		a ₃	Criollo
B	Condición de grano	b ₁	Grano amargo
		b ₂	Grano desamargado
		b ₃	Grano fermentado

Tabla 4: Análisis estadístico de varianzas ADEVA

Fuente de Variación	Grados de Libertad
Total	26
Factor A	2
Factor B	2
Interacción AxB	4
Error experimental (Grados de libertad)	18

5. RESULTADOS

5.1 DETERMINACIÓN DE LOS ANTINUTRIENTES

5.1.1 NITRATOS

5.1.1.1 CURVA DE CALIBRACIÓN

Para el acondicionamiento del método se realizó una curva de calibración, en base a las absorbancias obtenidas de las lecturas de los patrones de calibración en el equipo, se obtuvo la gráfica de relación Concentración vs. Absorbancia, que se muestra en la Figura 5.

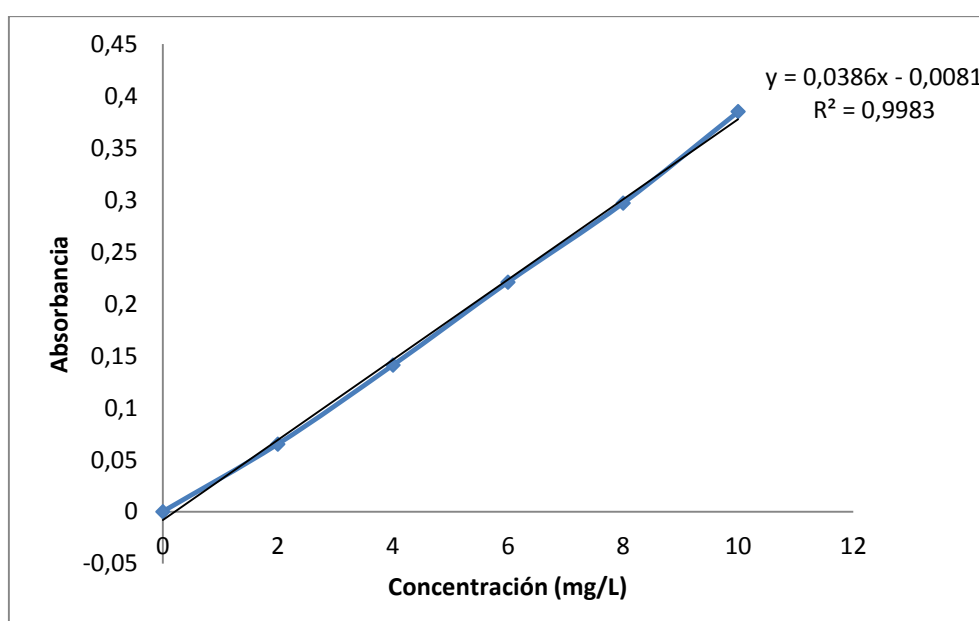


Figura 5. Curva de calibración para la determinación de nitrato.

Se observa que la curva de calibración de nitrato tiene una tendencia lineal y cumple con la ley de Beer, siendo la absorbancia directamente proporcional a la concentración, el ajuste lineal positivo con un r^2 de 0,9983 garantiza el resultado de la curva de calibración.

5.1.1.2 ANÁLISIS DE MUESTRAS

La determinación cuantitativa de nitratos en las tres variedades de chocho procedentes de los diferentes tratamientos se realizó por triplicado. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados de la concentración de nitrato en las tres variedades de chocho procedentes de los diferentes tratamientos

Variedad	Concentración (mg/L)	Concentración (mg/kg)
AMARGO		
Andino 450	8,448	366,077^b
Guaranguito 451	9,277	406,307^a
Criollo	8,750	379,827^b
DESAMARGADO		
Andino 450 ^{cd}	4,605	18,903^{cd}
Guaranguito 451	6,678	28,627^c
Criollo	5,262	21,817^c
FERMENTADO		
Andino 450	1,200	4,163^{de}
Guaranguito 451	0,622	1,150^e
Criollo	0,337	0,147^e

Los resultados que poseen letras iguales no son significativamente diferentes. Las muestras que se encuentran en el rango “a” tienen mayor contenido de nitratos y va bajando en los siguientes rangos estadísticos subsiguientes. Valores promedios de tres repeticiones –Prueba de Tukey al 5%

Al analizar los datos de la tabla 5, se pudo observar que la mayor concentración de nitratos se encuentra en la condición de grano amargo, en las

tres variedades de chocho, sin embargo la variedad guaranguito 451 presenta la mayor concentración de nitratos con una media de 406,307 mg por cada kg de alimento. Por otro lado se pudo observar que las variedades en condiciones de desamargado y fermentado tienen concentraciones distintas y menores respecto a la condición de amargo. La variedad con menor concentración es criollo en el proceso de fermentado con una concentración promedio de 0,147 mg por cada kg de alimento.

5.1.2 TANINOS

5.1.2.1 CURVA DE CALIBRACIÓN

Para el acondicionamiento del método se realizó una curva de calibración, en base a las absorbancias obtenidas de las lecturas de los patrones de calibración en el equipo, se obtuvo la gráfica de relación Concentración vs. Absorbancia, que se muestra en la Figura 6.

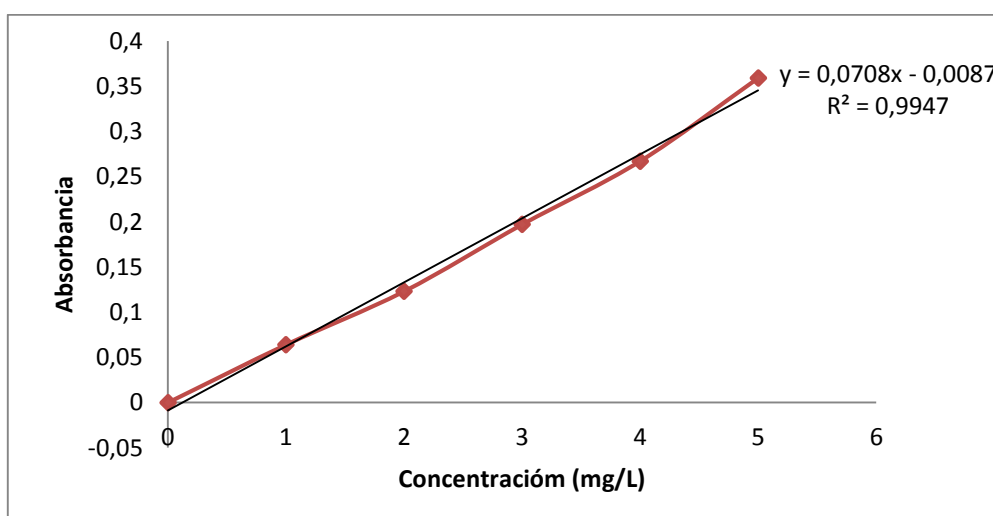


Figura 6. Curva de calibración para la determinación de taninos.

Se observa que la curva de calibración de taninos tiene una relación lineal entre la cantidad presente de estándares y la respuesta observada (absorbancia) con un coeficiente de correlación r^2 igual a 0,9947, así se confirma que cumple con los criterios de linealidad.

5.1.2.2 ANÁLISIS DE MUESTRAS

La determinación cuantitativa de taninos en las tres variedades de chocho procedentes de los diferentes tratamientos, se realizó por triplicado. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Resultados de la concentración de taninos en las tres variedades de chocho procedentes de los diferentes tratamientos

Variedad	Concentración (mg/L)	Concentración (mg/100g)	(%)
AMARGO			
Andino 450	4,760	949,861	1,033^b
Guaranguito 451	4,581	912,342	1,007^a
Criollo	5,001	997,780	1,087^a
DESAMARGADO			
Andino 450	0,778	154,636	0,160^d
Guaranguito 451	0,970	193,037	0,209^c
Criollo	1,027	204,481	0,213^c
FERMENTADO			
Andino 450	0,053	10,159	0,002^e
Guaranguito 451	0,025	13,647	0,003^e
Criollo	0,090	18,616	0,006^e

Los resultados que poseen letras iguales no son significativamente diferentes. Las muestras que se encuentran en el rango “a” tienen mayor contenido de taninos y va bajando en los siguientes rangos estadísticos subsiguientes. Valores promedios de tres repeticiones –Prueba de Tukey al 5%

Al analizar los datos de la tabla 6, se pudo observar que la mayor concentración de taninos se encuentra en la condición de grano amargo, en las tres variedades de chocho, sin embargo la variedad Criollo presenta la mayor concentración de taninos con un promedio de 997,780 mg por cada 100 g de muestra. Por otro lado se pudo observar que las variedades en condiciones de desamargado y fermentado tienen concentraciones distintas y menores respecto a la condición de amargo. La variedad con menor concentración es andino 450 en el proceso de fermentado con una concentración promedio de 10,159 mg por cada 100 g de muestra.

5.1.3 ALCALOIDES

5.1.3.1 ANÁLISIS DE MUESTRAS

La determinación cuantitativa de alcaloides en las tres variedades de chocho procedentes de los diferentes tratamientos, se realizó por triplicado. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 7.

Tabla 7. Resultados del porcentaje de alcaloides en las tres variedades de chocho procedentes de los diferentes tratamientos

Variedad	Base seca (%)	Media de las tres variedades (%)
AMARGO		
Andino 450	3,764 ^b	3,991
Guaranguito 451	4,469 ^a	
Criollo	3,741 ^b	
DESAMARGADO		
Andino 450	0,299 ^{cd}	0,321
Guaranguito 451	0,346 ^c	
Criollo	0,318 ^{cd}	
FERMENTADO		
Andino 450	0,031 ^e	0,077
Guaranguito 451	0,060 ^e	
Criollo	0,141 ^{de}	

Los resultados que poseen letras iguales no son significativamente diferentes. Las muestras que se encuentran en el rango “a” tienen mayor contenido de alcaloides y va bajando en los siguientes rangos estadísticos subsiguientes. Valores promedios de tres repeticiones –Prueba de Tukey al 5%

Al analizar los datos de la tabla 7, se pudo observar que la mayor concentración de alcaloides se encuentra en la condición de grano amargo, en las tres variedades de chocho, sin embargo la variedad guaranguito 451 presenta la mayor concentración de alcaloides con una media 4,469 %. Por otro lado se pudo observar que las variedades en condiciones de desamargado y fermentado tienen concentraciones distintas y menores respecto a la condición de amargo. La variedad con menor concentración es la andino 450 en el proceso de fermentado con una concentración promedio de 0,031 %.

5.1.4 ACTIVIDAD UREÁSICA

5.1.4.1 ANÁLISIS DE MUESTRAS

La determinación cualitativa de actividad ureasa en las tres variedades de chocho procedentes de los diferentes tratamientos, se realizó por triplicado. Los resultados obtenidos se detallan en la tabla 8.

Tabla 8. Valor de pH de actividad ureasa en las tres variedades de chocho procedentes de los diferentes tratamientos

Variedad	Blanco pH	pH	Unidades de Δ pH
AMARGO			
Andino 450	6,74	7,38	0,64^b
Guaranguito 451	6,78	7,50	0,72^a
Criollo	6,74	7,32	0,58^c
DESAMARGADO			
Andino 450	6,87	6,94	0,07^d
Guaranguito 451	6,83	6,91	0,08^d
Criollo	6,86	6,93	0,07^d
FERMENTADO			
Andino 450	6,84	6,89	0,05^d
Guaranguito 451	6,84	6,90	0,06^d
Criollo	6,91	6,97	0,06^d

Los resultados que poseen letras iguales no son significativamente diferentes. Las muestras que se encuentran en el rango “a” tienen mayor contenido de actividad ureásica y va bajando en los siguientes rangos estadísticos subsiguientes. Valores promedios de tres repeticiones –Prueba de Tukey al 5%

Al analizar los datos de la tabla 8, se pudo observar que los valores de pH en la condición de grano amargo son altos, en las tres variedades de chocho por

lo que indica que persiste la actividad de los factores antinutricionales. Por otro lado se pudo observar que las variedades de chocho en condiciones de desamargado y fermentado tienen una disminución de pH de 0,05 a 0,08 unidades lo que disminuye respecto a la condición de grano amargo.

5.1.4 ÁCIDO FÍTICO

5.1.4.1 ANÁLISIS DE MUESTRAS

La determinación cuantitativa de ácido fítico en las tres variedades de chocho procedentes de los diferentes tratamientos, se realizaron por triplicado. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 9.

Tabla 9. Resultados del contenido de ácido fítico en las tres variedades de chocho procedentes de los diferentes tratamientos

Variedad	Δ Abs (Fósforo)	Fósforo (g/100g)	Ácido Fítico (g/100g) Base seca
AMARGO			
Andino 450	0,113	0,064	0,247^b
Guaranguito 451	0,134	0,076	0,296^b
Criollo	0,174	0,099	0,392^a
DESAMARGADO			
Andino 450	0,061	0,035	0,127^c
Guaranguito 451	0,074	0,042	0,160^c
Criollo	0,062	0,035	0,130^c
FERMENTADO			
Andino 450	0,028	0,016	0,054^d
Guaranguito 451	0,019	0,010	0,030^d
Criollo	0,033	0,018	0,066^d

Los resultados que poseen letras iguales no son significativamente diferentes. Las muestras que se encuentran en el rango “a” tienen mayor contenido de ácido fítico y va bajando en los siguientes rangos estadísticos subsiguientes. Valores promedios de tres repeticiones –Prueba de Tukey al 5%

Al analizar los datos de la tabla 9, se pudo observar que la mayor concentración de ácido fítico se encuentra en la condición de grano amargo, en las tres variedades de chocho, sin embargo la variedad Criollo presenta la mayor concentración de ácido fítico con un promedio de 0,392 g por 100 g de alimento. Por otro lado se pudo observar que las variedades en condiciones de desamargado y fermentado tienen concentraciones diferentes y menores respecto a la condición de amargo. La variedad con menor concentración es la guaranguito 451 en el proceso de fermentado con una concentración promedio de 0,030 g por 100 g de alimento.

5.1.6 INHIBIDORES DE TRIPSINA

5.1.6.1 ANÁLISIS DE MUESTRAS

La determinación cuantitativa de inhibidores de tripsina en las tres variedades de chocho procedentes de los diferentes tratamientos, se realizaron por triplicado. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Resultados de concentración de inhibidores de tripsina en las tres variedades de chocho procedentes de los diferentes tratamientos

Variedad	TIA (Inhibidor de la actividad tripsina) (mg/g)	Concentración UTI/mg
AMARGO		
Andino 450	0,789	1,499^c
Guaranguito 451	0,969	1,841^a
Criollo	0,822	1,562^b
DESAMARGADO		
Andino 450	0,224	0,425^e
Guaranguito 451	0,256	0,487^d
Criollo	0,249	0,472^{de}
FERMENTADO		
Andino 450	0,055	0,104^f
Guaranguito 451	0,017	0,032^g
Criollo	0,055	0,105^f

Los resultados que poseen letras iguales no son significativamente diferentes. Las muestras que se encuentran en el rango “a” tienen mayor contenido de inhibidores de tripsina y va bajando en los siguientes rangos estadísticos subsiguientes. Valores promedios de tres repeticiones –Prueba de Tukey al 5%

Al analizar los datos de la Tabla 10, se pudo observar que la mayor concentración de inhibidores de tripsina se encuentra en la condición de grano amargo, en las tres variedades de chocho, sin embargo la variedad guaranguito 451 presenta la mayor concentración de tripsina con una media de 1,841 UTI/mg. Por otro lado se pudo observar que las variedades en condiciones de desamargado y fermentado tienen concentraciones distintas y menores respecto a la condición de amargo. La variedad con menor concentración es la guaranguito

451 en el proceso de fermentado con una concentración media de 0,032 UTI/mg.

5.2 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS APLICADOS SOBRE LOS ANTINUTRIENTES EN EL GRANO DE CHOCHO

Tabla 11. Porcentaje de disminución de la concentración de antinutrientes en las tres variedades de chocho procedentes de los diferentes tratamientos.

Antinutrientes	Tratamientos	
	Desamargado (%)	Fermentado (%)
Nitratos	93,98	0,47
Taninos	80,69	1,49
Alcaloides	91,96	1,93
Actividad Ureasa	89,24	2,05
Ácido Fítico	55,45	16,34
Inhibidores de Tripsina	71,73	4,95

Se observa que los tratamientos empleados en la eliminación de antinutrientes presentan una disminución notable en los dos tratamientos aplicados al grano, presentando valores muy cercanos al 100% en el tratamiento de desamargado, mientras que en el fermentado se tienen porcentajes bajos ya que presentan la eliminación del contenido residual de estas sustancias provenientes del proceso de desamargado.

6. DISCUSIÓN

6.1. NITRATOS

La determinación de los niveles de nitrato en el chocho se evaluó en base a la variedad y condición del grano, teniendo en cuenta sobre los niveles de éste o de metabolitos relevantes que pueden estar presentes en este grano. El nitrato

como se conoce es un compuesto de origen natural y es un componente importante que está presente en verduras y leguminosas debido a su potencial de acumulación de este compuesto.

Se ha encontrado que los frijoles presentan una concentración de nitratos con valores entre 392 a 810 mg/kg (EFSA, 2008), mientras que el contenido de nitratos en chocho varió entre 366 a 406 mg/kg, en la condición de grano amargo, como se observa en la tabla 5, esto indica que los valores obtenidos de nitratos en chocho tienen una similitud al existente en los frijoles y otros granos.

Los procesos de desamargado y fermentado aplicados a los granos de chocho ayudaron a disminuir el contenido de nitratos en un 93,98% y 0,47% respectivamente, de la concentración original en condición de chocho amargo, como se muestra en la tabla 11. De acuerdo con el análisis estadístico ANOVA se encontró que existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre ambos procesos, debido a que la diferencia entre las medias comparten un distinto rango estadístico. En el proceso de desamargado se muestra que existe reducción en los niveles de nitratos, debido a la hidrosolubilidad de los mismos. Según Gómez (2013) la disminución de estas sustancias se da durante la cocción y depende de: la temperatura del agua, la superficie de contacto y la relación agua/vegetal. Con el proceso de fermentado se potencia la disminución de los nitratos como se ve en la tabla 5, probablemente debido a la acción hidrolítica de las enzimas del moho sobre los diferentes componentes químicos del grano en este caso a la disminución de los niveles restantes de nitrato.

Se conoce que el nitrato ingresa predominantemente al cuerpo de forma exógena a partir de verduras, agua y otros alimentos, pero la exposición al nitrito es de manera endógena a través del metabolismo del nitrato. Las fuentes más importantes de ingesta dietética de nitrato son las hortalizas y las frutas que aportan entre el 50 y 75 % de la ingesta dietética total (EFSA, 2008).

Según EFSA (2008) el nitrato se absorbe rápidamente desde el tracto gastrointestinal en el plasma en los seres humanos y al menos el 25 % del nitrato es secretado en la saliva y el 20 % de nitrato salivar secretado se convierten en

nitrito por microorganismos en la lengua. Sin embargo los adultos tienen una conversión salivar de nitrato a nitrito de 5 a 7 % de la ingesta total de nitrato. En el estómago bajo condiciones ácidas, el nitrito se transforma en óxido nítrico y otros metabolitos. La mayor parte del nitrato absorbido se excreta en última instancia en la orina. De esta forma el nitrato es relativamente no tóxico, su toxicidad se da en la formación de nitrito y su capacidad de reaccionar para formar compuestos N-nitrosos.

La ingesta diaria aceptada (IDA) de nitratos es de 3,70 mg/Kg de peso corporal (EFSA, 2008), por ejemplo una persona adulta de 60 kg de peso podría admitir 222 mg de nitrato por día, pero se debe tomar en cuenta que existen otras fuentes de nitratos, como la proveniente del agua potable u otros alimentos como los embutidos, por lo que es recomendable que el aporte de nitratos de fuentes vegetales en este caso no supere los 157 mg/día, nivel seguro para el consumo humano en condición de desamargado y fermentado en cantidades inferiores a 500 g al día.

Estudios anteriores han demostrado la reducción de los niveles de nitratos cuando las verduras se cocinan en agua, como guisantes, col, frijoles, espinacas entre otras, perdieron entre el 16 y el 79% de este componente, respectivamente durante la cocción (EFSA, 2008). Por lo tanto, los procesos de desamargado y fermentado reducen significativamente la cantidad de nitratos en el grano de chocho y otras verduras.

Tanto los factores medioambientales como las condiciones agrícolas pueden influenciar en la concentración de nitratos en leguminosas y en vegetales. Entre los primeros se incluyen: la estación, composición del suelo, intensidad luminosa y temperatura; mientras que entre los factores agrícolas se mencionan: la variedad de planta, fertilización y manejo del cultivo (EFSA, 2008).

Los efectos beneficiosos que presenta el nitrato en la salud se da por su uso como aditivo alimentario, por sus propiedades antibacterianas contra el patógeno potencialmente letal *Clostridium botulinum*, y una buena eficacia endógena contra la gastroenteritis bacteriana (EFSA, 2008). Según Lundberg,

Weitzberg y Gladwin (2008) una dieta que contenga nitratos a niveles dentro de la IDA puede apoyar de manera beneficiosa los grupos de nitrato y nitrito endógenos del cuerpo, en la reducción de bacterias nocivas.

6.2 TANINOS

La determinación de la concentración de taninos en el chocho se analizó en base a la variedad y condición del grano. Los taninos como se conoce son compuestos polifenólicos de estructura variada desde los más simples hasta los más complejos de peso molecular alto.

En la Tabla 6, se muestran los resultados de la determinación de taninos en las tres variedades de chocho y su tratamiento; en la condición de grano amargo se obtuvo valores de 912,342 a 997,785 mg/100g. Como referencia se tiene la concentración de taninos en dos tipos de granos las cuales son el grano de amaranto y sorgo con valores de $252,42 \pm 16,653$ mg/100g y $2927 \pm 335,38$ mg/100g respectivamente (Vázquez et al., 2012; Gómez, 2013). Esto señala que el grano de chocho en su condición nativa (amargo), muestra claramente que tiene valores superiores de taninos con relación al grano de amaranto y muy cercanos a los de sorgo. Como se conoce los vegetales, leguminosas y frutos tienen la capacidad de acumular taninos en la totalidad de la planta de la que provienen: semillas, frutos, tallo, raíz, hojas; estos representan del 2 al 7% del peso fresco de la planta (Vázquez et al., 2012), por lo que la distribución de taninos en la planta no es igual en todas las zonas, y en ciertos sectores de la planta se tienen mayor acumulación de taninos que en otras. Se puede ver claramente que el grano de chocho en condición de amargo tiene una acumulación de taninos de **1%** aproximadamente, en relación al porcentaje de la planta total como se muestra en la Tabla 6.

Los procesos de desamargado y fermentado aplicados a los granos de chocho ayudaron a disminuir el contenido de taninos en un 80,69% y 1,49% respectivamente de la concentración original en condición de chocho amargo, como se observa en la tabla 11. De acuerdo con el análisis estadístico ANOVA se encontró que si existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre ambos procesos. Con

el proceso de desamargado se registra una reducción en los niveles de taninos, por otro lado el contenido de estos varió significativamente con el proceso de fermentado, respecto al tratamiento de desamargado ubicándose en un distinto rango estadístico. Estudios realizados reportan una reducción en el contenido de taninos, en frijoles terciopelo, empleando métodos de: remojo, cocción, germinación y tostado (Gurumoorthi, Janardhanan y Myhrman, 2008); lo que indica que la reducción de taninos en el proceso de desamargado se dio en base a la hidrosolubilidad de estas sustancias, mientras que en la fermentación podría tener su origen en la oxidación degradativa, con ayuda de la temperatura de incubación.

Existen diversos factores que afectan a la concentración de taninos los cuales son: las condiciones medioambientales, genéticas, estado de maduración de la planta y la parte del fruto, esto quiere decir que se puede hallar estas sustancias hasta en las cáscaras del fruto (Vázquez et al., 2012).

En otros estudios indican que estos compuestos tienen actividad anticancerígena, antidiabética, antibacterial, anticarcinogénica y antioxidante, en modelos experimentales *in vitro*; en cuanto a su actividad antioxidante fue capaz de neutralizar, especies altamente reactivas como radicales libres los cuales son el superóxido y radical hidroxilo, así como reducción de la peroxidación de lípidos de membranas celulares (Vázquez, 2012).

Otro estudio sugiere que la administración de taninos disminuye las concentraciones de LDL en plasma y aumenta las lipoproteínas de alta densidad HDL conocido como “colesterol bueno”. Algunos de estos beneficios pueden ser la inhibición lipídica, así como su efecto anticarcinogénico, que está ligado a prevenir daños al ADN causados por radicales libres, y el posterior desarrollo de células mutantes o cancerígenas (Vázquez et al., 2012).

Se señala que el efecto positivo o negativo de los compuestos polifenólicos depende de la cantidad en que son ingeridos por el consumidor, no se conocen datos de IDA de taninos, pero se recomienda que su consumo diario sea menor a 1000 mg/kg de peso corporal para evitar toxicidad, existen estudios que estiman

una ingesta aproximada de polifenoles en 800 mg al día, este valor esta dado en base a la determinación de compuestos fenólicos totales. De este valor solo un porcentaje son taninos en la dieta, porque aún no se determina la cantidad exacta de la ingesta diaria recomendada; no obstante los valores de chocho en condición de desamargado y fermentado no es perjudicial ya que se encuentran dentro de los niveles permisibles (Sánchez et al., 2008; Vázquez et al., 2012).

Es difícil llegar a las dosis de 1000 mg/kg de estos compuestos, ya que los hábitos alimenticios no permiten la ingesta de grandes cantidades de taninos, por ejemplo, existe la costumbre de remojar los frijoles u otro tipo de leguminosas, antes de su cocción, lo que disminuye drásticamente la cantidad de polímeros polifenólicos presentes. Además, se estima que una baja concentración de taninos garantiza buenos porcentajes de digestibilidad y no interfieren con la absorción de proteínas, lo que contribuye al buen estado alimentario de las personas que consumen chocho como componente en su dieta (Melo y Ligarreto, 2010).

6.3 ALCALOIDES

La determinación del porcentaje de alcaloides en el chocho se lo analizó en base a la variedad y condición del grano. Los alcaloides como se conoce son compuestos quinolizidínicos que poseen un heterociclo nitrogenado bicíclico, con carácter básico, que otorga al grano un carácter tóxico y sabor amargo (Rodríguez, 2009).

En la Tabla 7, se muestran los resultados de la determinación de alcaloides en las tres variedades de chocho y su diferente condición de grano; en la condición de grano amargo (crudo), se obtuvo valores de 3,741 a 4,469 %. Como referencia se tiene la proporción de alcaloides en el grano de lupino crudo que va desde 0,02 a 4,45% (FAO, 1982). Esto indica que el porcentaje de alcaloides analizado está dentro del rango reportado en otros estudios.

Como se conoce los alcaloides quinolizidinicos están ampliamente distribuidos entre las leguminosas *Lotoideas*, siendo los lupinos los más ricos en

este tipo de alcaloides. Pueden alcanzar concentraciones superiores a 200 mM en tejidos epidérmicos, mientras que en el mesófilo presentan valores inferiores de 5 mM. Estos alcaloides constituyen el principal obstáculo para la utilización directa del chocho ya que su alto contenido determina que los granos sean tóxicos y amargos, por lo que se emplea procesos térmicos para la eliminación de estos compuestos (Rodríguez, 2009).

En los procesos de desamargado y fermentado aplicados a los granos de chocho ayudaron a disminuir el contenido de alcaloides en un 91,96% y 1,93% respecto a la concentración original en condición de chocho amargo, como se observa en la tabla 11. De acuerdo con el análisis estadístico ANOVA se encontró que si existe diferencia significativa con el proceso de fermentado ($p \leq 0.05$) respecto al proceso de desamargado ubicándose en un distinto rango estadístico.

En el proceso de desamargado se muestra que existe reducción en los niveles de alcaloides de una media de 3,991% en estado crudo a una media de 0,321% de las tres variedades, mientras en el proceso de fermentado redujo a un valor medio de 0,077%, como se observa en la Tabla 7. Acorde con la norma *INEN 2390:2004 de Leguminosas. Grano desamargado de chocho* se debe tener un valor de 0,07% de alcaloides totales, se considera seguro para el consumo humano y animal. En base a estos resultados se considera que los procesos de desamargado y fermentado, no se tuvo una buena adecuación o faltó mayor tiempo de remojo y de cocción; la etapa de remojo juega un rol importante en la ganancia de peso del grano, y un tiempo de 6 a 8 horas se considera adecuado, mientras que si se extiende ese tiempo como por ejemplo 18 horas puede influir negativamente en la salida de nutrientes del grano, incluido proteína soluble en agua. Por otro lado, en la etapa de cocción se considera que 60 minutos es un tiempo óptimo, debido a que minimiza la energía consumida y la concentración de alcaloides, ya que a mayor tiempo el contenido de alcaloides no puede ser cuantificado (INEN 2390, 2004; Gutiérrez, Infantes, Pascual y Zamora, 2016).

Sin embargo, las desventajas de estos procesos incluyen pérdidas de masa, incertidumbre respecto a la seguridad química del producto y un impacto ambiental negativo. A pesar de esto, es aceptado como ventajoso debido a que

previene despojo de productos químicos al ambiente y cambios en las características de calidad del producto como se da en otros procesos (Gutiérrez et al., 2016).

Los alcaloides quinolizidínicos se les considera como un antinutriente debido a que dan el sabor amargo o picante al grano de chocho, por lo que da repulsión al hombre y a los animales, en caso de ser ingeridos en altas cantidades provocan intoxicación que se manifiesta por mal funcionamiento de los órganos (hígado, corazón, páncreas riñones, SNC), sin embargo, no se conoce con exactitud cómo se llevan a cabo dichos efectos tóxicos (Rodríguez, 2009).

La toxicidad de estos compuestos se da en dosis muy altas tanto en humanos como en animales, las dosis comprendidas entre 11 a 25 mg/kg de peso corporal de niños y dosis de 25 a 46 mg/kg de peso corporal en adultos produce intoxicaciones graves como: midriasis (dilatación anormal de las pupilas), calambres, parálisis respiratoria, dolores estomacales y vómitos (INIAP, 2009).

Por otra parte estos compuestos poseen beneficios dentro y fuera de la planta, como su principal función de defensa química contra insectos, bacterias, hongos, virus, ataque de herbívoros y microorganismos patógenos, actuando como fitoalexinas, mientras que en el campo farmacológico e industrial tienen un gran potencial como agentes fungicidas, insecticidas, bactericidas y nematocidas; la administración de alcaloides puede disminuir el riesgo de hipoglucemia que se produce por algunos hipoglucemiantes orales que estimulan la secreción de insulina en presencia de bajas concentraciones de glucosa (INIAP, 2009; Rodríguez, 2009).

Para que los alcaloides sean efectivos, necesitan estar presentes en el momento adecuado, sitio y con la cantidad justa, su metabolismo debe ser optimizado y coordinado en la mayoría de los sistemas para que pueda cumplir sus funciones (Villacreses, 2011).

6.4 ACTIVIDAD UREÁSICA

La determinación de la actividad ureasa en el chocho está enfocada en el grado de inactivación de la enzima hidrolizante de la urea, se lo analizó en base a la variedad y condición del grano. Además, es una medida indirecta de la eliminación de otros factores antinutricionales relacionados a la proteína de chocho, que son inactivados en forma simultánea a la ureasa.

En la Tabla 8, se muestran los resultados de la determinación de la actividad ureasa; en la condición de grano amargo (crudo), se obtuvo valores en diferencia de pH 0,58 a 0,72, lo que indica una considerable concentración de otros antinutrientes. Como referencia se tiene el valor de ureasa, en otra leguminosa la cual es la soya con un rango de valor de 1,8 a 2,1 unidades de pH, en estado crudo (Pariona, 2016). Unidades de pH altos en alimentos indica que persiste la actividad de factores antinutricionales, lo cual hace inapropiado para su uso como alimento, por lo que se debe aplicar procesos térmicos para poder eliminarlos. Se aplica la prueba de actividad ureásica para conocer si el grano de chocho ha recibido un procesamiento adecuado para la eliminación de antinutrientes (Dudley-Cash, 2003).

En los procesos de desamargado y fermentado aplicados a los granos de chocho ayudaron a disminuir la actividad ureasa en un 89,24% y 2,05% respecto de la concentración original en condición de chocho amargo, como se observa en la tabla 11. De acuerdo con el análisis estadístico ANOVA se encontró que existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre ambos procesos. En el proceso de desamargado se muestra que existe reducción en los niveles de pH, sin embargo la actividad ureasa si varió significativamente con el proceso de fermentado respecto al proceso de desamargado ubicándose en un distinto rango estadístico.

Estos dos procesos redujeron la actividad ureasa de forma drástica hasta niveles de 0,05 a 0,08 unidades de pH, lo que indica que si hay una reducción importante. En base a estos resultados se considera que el calor que se aplicó durante su procesamiento fue el adecuado por lo que la actividad de la enzima fue inhibida, reduciendo la producción de amoníaco. Como se observa en la Tabla 8,

el pH se mantiene con una ligera variación, con los procesos de desamargado y fermentado. Por otro lado se debe evitar el calentamiento excesivo, ya que se puede destruir algunos aminoácidos y así puede reducir su digestibilidad. Además, valores muy bajos de actividad ureasa (próximos a cero) indican la posibilidad de que esa muestra ha sufrido sobrecalentamiento, afectando su valor nutricional (Dudley-Cash, 2003).

Se considera que cuando la actividad ureasa es mínima los demás factores antinutricionales también han dejado de ser activos o se encuentran en bajas proporciones. Como se conoce la ureasa no es perjudicial, es de naturaleza proteica y distinta termoestabilidad que se inactiva por tratamientos térmicos durante el acondicionamiento. Los factores que ayudan a la desactivación de esta enzima son: la temperatura, el tiempo de aplicación y las condiciones de humedad a las que se lleva a cabo y deben ser rigurosamente controlados, debido a que se corre el riesgo de disminuir la biodisponibilidad de aminoácidos esenciales como la lisina, con defectos nutricionales (Dudley-Cash, 2003).

No se tiene estudios previos sobre la cantidad correspondiente de actividad ureasa en el chocho, pero según la FAO se establece que si un alimento presenta valores de 0,05 a 0,30 unidades de pH, indica que cualquier alimento ha recibido un procesamiento adecuado, por este motivo el chocho en sus dos tratamientos (desamargado y fermentado) pueden ser usados como ingrediente alimenticio (FAO, 2017).

6.5 ÁCIDO FÍTICO

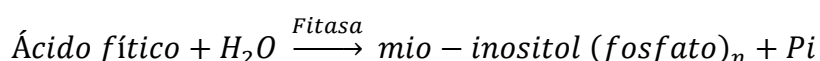
La determinación de ácido fítico se lo realizó en base a la condición y variedad de chocho, y es un importante compuesto de almacenamiento de fósforo que está en la mayoría de semillas, leguminosas y granos de cereales, en una distribución de 1 a 7% de peso seco (Megazyne, 2007). En la tabla 9, se observa los resultados de la determinación de ácido fítico en las tres variedades y en las distintas condiciones de grano; en la condición de grano amargo se obtuvo

valores de 0,247 a 0,392 g/100g, lo que se observa que es un valor menor a lo que se ha encontrado en el altramuza (*Lupinus albus*), donde se ha encontrado niveles de ácido fítico de 0,5 g/100g, similar al encontrado en guisantes y harina de soya; en otro tipo de leguminosa como el grano de amaranto se obtuvo valores de ácido fítico de 0,83 g/100g (García, 2013; Gómez, 2013). Esto muestra que el grano de chocho en condición nativa (amargo), posee valores distintos e inferiores a los reportados en el altramuza, infiriendo que la especie y las condiciones agrícolas influyen en la concentración de fitato.

Los procesos de desamargado y fermentado aplicados a los granos de chocho ayudaron a disminuir el contenido de ácido fítico en un 55,45% y 16,34% respectivamente, de la concentración original en condición de chocho amargo, como se observa en la tabla 11. En el proceso de desamargado se muestra que existe reducción en los niveles de ácido fítico, sin embargo su contenido de ácido fítico sí varió significativamente con el proceso de fermentado ($p \leq 0.05$) respecto al proceso de desamargado ubicándose en un distinto rango estadístico. Estudios reportaron una reducción en el contenido ácido fítico después del remojo de frejol cultivado en África, esta disminución se atribuye a la hidrosolubilidad del ácido fítico (Gómez, 2013).

Los métodos de procesamiento del grano de chocho significativamente ($p \leq 0.05$) redujeron el contenido de ácido fítico en las tres variedades de chocho, en el proceso de desamargado, que consiste en remojo y cocción se obtuvo una disminución relevante. Probablemente, en el remojo del grano, se produce una mayor pérdida por lixiviación del compuesto, por lo que se pudo haber dado la hidrólisis parcial de ácido fítico restante, mientras que con el proceso de fermentación sólida se obtuvo una mayor disminución de ácido fítico, probablemente por la conversión de fosfatos de inositol a inositol por la acción de los tratamientos térmicos empleados en el proceso de desamargado. Es importante señalar que los niveles de ácido fítico en cereales y leguminosas están influenciados por varios factores, como la variedad del grano, zona de cultivo, calidad de molienda, entre otras (Hassan, Osman y Babiker, 2005).

Durante el procesamiento de alimentos y la digestión, el ácido fítico se somete a un desfosforilado para producir productos de degradación, tales como: penta, tetra y trifosfato mediante la acción de fitasas endógenas que se encuentran en el tracto gastrointestinal humano por acción de tres fuentes: fitasas dietética, fitasas de la flora bacteriana en el intestino y fitasa de la mucosa intestinal (Zhou y Erdman, 1995). El principio de la reacción se da por acción de la fitasa hidroliza al ácido fítico (fitato, mio-inositol hexafosfato) en mio-inositol (fosfato)_n y fosfato inorgánico (Pi) (Megazyne, 2007).



El ácido fítico ha sido considerado un antinutriente debido a su efecto inhibitor sobre la biodisponibilidad de minerales; posee una gran capacidad quelante con cationes multivalentes, los cationes di y trivalentes para formar complejos, los minerales que tienden a formar complejos son el zinc, el hierro, el calcio y el propio fósforo del ácido fítico. La unión puede formar sales muy insolubles que son mal absorbidas desde el tracto gastrointestinal, lo que da como resultado una biodisponibilidad pobre de minerales (Zhou y Erdman, 1995).

En seres humanos se indicó que el ácido fítico tenía un efecto inhibitor muy fuerte sobre la absorción de hierro, esta inhibición podría ser contrarrestada por la adición de ácido ascórbico (Zhou y Erdman, 1995).

Por otra parte la capacidad para quelar minerales tiene algunos beneficios, como la no formación de radicales libres o radical hidroxilo (-OH) catalizada con hierro por quelación de hierro libre y después bloqueo del sitio de coordinación; el Fe²⁺ ha demostrado causar la producción de peroxidación oxirradical y lipídica, mientras que Fe³⁺ es relativamente inerte, esto se da por un alto almacenamiento de hierro en el cuerpo. Otra ventaja es la inhibición de cinc, generando la reducción en el efecto antagonizador de cinc sobre la absorción de cobre. Además disminuye el riesgo de cáncer de colon mediado por hierro y la reducción del colesterol sérico y triglicéridos en animales de experimentación. El fitato también se considera un antioxidante natural teniendo funciones potenciales

de reducción de la peroxidación de lípidos y como conservante en alimentos, teniendo la capacidad de inhibir la formación de radicales libres mediada por el hierro; también se previene enfermedades del corazón, formación de cálculos renales y reduce el riesgo de cáncer de colon (Zhou y Erdman, 1995).

La IDA de ácido fítico no debe superar los 70 mg/kg de peso corporal, ya que ingestas mayores genera disminución en la absorción de calcio, hierro, zinc y magnesio en el organismo; por ejemplo, en una persona de 60 kg de peso, la IDA sería de 4200 mg, por lo que se podría consumir alrededor de 380 mg al día, por lo que se podría acoger esta cantidad para una ingesta en la dieta diaria del grano de chocho en condición de desamargado y fermentado. Sin embargo, no se debe administrar a seres humanos que poseen un estatus pobre o marginal de zinc, hierro o calcio (Gómez, 2013; Zhou y Erdman, 1995).

6.6 INHIBIDORES DE TRIPSINA

El contenido de inhibidores de tripsina en el grano de chocho en la condición de amargo en las tres variedades vario entre 1,499 a 1,841 UIT (unidades de inhibidores de tripsina) por mg de muestra, como se observa en la Tabla 10. El contenido obtenido es mayor al encontrado por García (2013), en el altramuz (*Lupinus lateus*) con un valor de 1,3 UIT por cada mg de muestra. Esto señala que el grano de chocho en condición de amargo, posee valores superiores a los reportados en el altramuz, probablemente la especie y condición agrícola influyen en las concentraciones de este antinutriente.

Los procesos de desamargado y fermentado aplicados a los granos de chocho ayudaron a disminuir el contenido de inhibidores de tripsina en un 71,726% y 4,95% respectivamente, con respecto a la concentración en condición de chocho amargo, como se observa en la tabla 11. En el proceso de desamargado se muestra que existe reducción en los niveles de inhibidores de tripsina, sin embargo su contenido si varió significativamente con el proceso de fermentado ($p \leq 0.05$) respecto al proceso de desamargado ubicándose en un distinto rango estadístico. La pérdida de inhibidores de tripsina durante el proceso de desamargado puede ser causada por el cambio de gradiente en la

concentración, lo que provoca una tasa de difusión de los compuestos, y causa una reducción notable de los niveles de inhibidores de tripsina, debido a la naturaleza termolábil de los inhibidores de la enzima (Gómez, 2013). En el proceso de fermentado se da una disminución de este compuesto, posiblemente coadyuvado por la temperatura de incubación aplicada en el proceso, sin embargo, los inhibidores de tripsina y quimiotripsina, suelen quedar con un valor residual inhibidor de 5-20%; dado que son proteínas, el grado de inhibición depende de la temperatura, el tiempo de tratamiento, el volumen del alimento y el contenido de agua. Sin embargo, un tratamiento térmico severo puede disminuir la calidad proteica, por lo que es importante controlar el tiempo y la temperatura de cocción. Como no se reduce totalmente el inhibidor de tripsina, puede generar desnaturalización de proteína (reducir los aminoácidos lisina y cisteína) y generar nitritos cancerígenos (Ortega, 2012; García, 2013; Gómez, 2013).

El tratamiento térmico al chocho ayuda a cambios en la estructura proteica que lo hacen más digerible y la remoción de los inhibidores de tripsina. En base a esto podría considerarse que, con los procesos empleados, se logra una mejora importante en términos de digestibilidad de nutrientes sin que se produzca una caída de los IT a los niveles alcanzados con los procesos de desamargado y fermentado.

Según García (2013), la efectividad de los tratamientos por calor depende del pH, la temperatura, el tiempo de calentamiento, las condiciones de humedad, el tamaño de partícula y el tipo de semillas, por tanto es recomendable aplicar métodos combinados para minimizar el daño en la calidad nutricional del alimento y promover una mayor inactivación.

No hay evidencia que los inhibidores de tripsina tengan algún efecto adverso con el crecimiento y la salud humana, muchos estudios sugieren que este compuesto presenta ciertas propiedades benéficas como la actividad antibacteriana, anti-fúngica y sobre todo la anticancerígena al suprimir tanto tumores malignos como benignos, además se puede prevenir la carcinogénesis de colon y suprimir la carcinogénesis en el hígado en un 71%, en el epitelio oral en un 86% y en el pulmón en un 48%. Se los ha empleado como

quimiopreventivos de cáncer, eficaces como agentes anticancerígenos en concentraciones molares extremadamente bajas, mientras que la mayoría de los otros agentes anticancerígenos son eficaces solo a niveles altos. Además, presenta actividad antioxidante reduciendo efectos de los radicales libres en las células y de ese modo disminuyen la extensión del daño oxidativo (García, 2013).

La IDA de inhibidores de tripsina no se conoce, sin embargo, se debe considerar que son proteínas que tienen la propiedad de inhibir la enzima tripsina en una relación 1:1 molar, por lo que se estima que es necesario reducir el contenido en alimentos (Valle y Florentino; 2000).

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 CONCLUSIONES

Se determinó que el chocho variedad Guaranguito 451 en la condición de amargo presentó un mayor contenido de nitratos, taninos, alcaloides, actividad ureasa, ácido fítico e inhibidores de tripsina en base seca.

Se evidenció que los tres chochos analizados: variedad Andino 450, Guaranguito 451, y Criollo en condiciones de grano fermentado tuvieron un contenido similar de antinutrientes al no tener valores significativamente diferentes.

La aplicación de los procesos de desamargado y fermentado a los granos de chocho de las tres variedades ayudó a reducir significativamente el contenido de los antinutrientes, sin embargo se obtuvo mayor porcentaje de disminución con el proceso de desamargado, por lo que solo bastaría con la aplicación de este tratamiento para el consumo de este grano.

El tratamiento de fermentado empleado en las muestras en base a la activación de las enzimas biodegradatorias provenientes de *R.oligosporus*, maximiza la reducción de los antinutrientes presentes en los granos desamargados, sin embargo este tratamiento no está al alcance de los consumidores regulares del chocho.

En el tratamiento de desamargado existen factores en la cocción como temperatura del agua, la superficie de contacto y la relación agua/vegetal, los cuales ayudan a disminuir los antinutrientes del chocho.

Los analitos que experimentaron mayor reducción en los granos de chocho de las tres variedades en condición de desamargado fueron nitratos y alcaloides, probablemente debido a su hidrosolubilidad y termolabilidad, mientras que con el proceso de fermentado fueron el ácido fítico e inhibidores de tripsina,

posiblemente por la activación de las enzimas biodegradatorias por parte del moho (*Rhizopus oligosporus*).

Las dosis de IDA para obtener efectos nocivos de estas sustancias son elevadas, lo cual es improbable con el consumo habitual del chocho, debido a que este no se consume en su estado nativo (amargo) y con los tratamientos empleados se reduce sustancialmente la concentración de estos antinutrientes.

Según el INIAP adicionalmente el contenido residual mínimo que se obtiene de antinutrientes después del desamargado puede ser beneficioso para el hombre, considerando las propiedades farmacológicas de algunos de estos.

7.2 RECOMENDACIONES

Se recomienda efectuar ensayos de reducción de antinutrientes a diferentes condiciones en el proceso de desamargado, como el tiempo de cocción, remojo, corriente de agua y temperatura y evaluar si cambia radicalmente el contenido de antinutrientes en el grano de chocho.

Los granos de chocho de las tres variedades, en estado crudo (amargo) presentan importantes contenidos de antinutrientes como: nitratos, taninos, alcaloides, ácido fítico, actividad ureasa e inhibidores de tripsina, por lo que se recomienda estudiar la actividad biológica de cada uno, su aplicabilidad en el campo farmacéutico, agrícola, industrial y cosmético.

Se recomienda ensayar con distintos mohos y diferentes tipos de fermentación en el grano de chocho para determinar una posible eliminación completa del contenido de antinutrientes y emplearlos en otros estudios con granos diferentes.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allauca, V. (2005). Desarrollo de la tecnología de elaboración de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) germinado fresco para aumentar el valor nutritivo del grano (Disertación de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Antón, A., Lizaso, J. (2002). Nitritos, Nitratos y Nitrosaminas. *Fundación Ibérica para la seguridad Alimentaria*, 30, 1-7. Recuperado de: http://www.Proyectopandora.es/wp-content/uploads/Bibliografia/13181019_nitritos_nitratos.pdf
- A.O.A.C. Association of official Analytical Chemist, 952.03,1964. Métodos. Peer Verifed Methods. Manual on Polices and Procedures, Arlington, Estados Unidos.
- Arias, L. (1985). Análisis Comparativos de Dos Métodos de Aislamiento y Determinación de Alcaloides de *Lupinus mutabilis*. (Disertación de pregrado). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. pp. 57-60.
- AACC. American Association of Cereal Chemists, Method 22-90. (2000). Measurement of Urease Activity. Recuperado de: <http://methods.aaccnet.org/summaries/22-90-01.aspx>
- Brutenon, J. (1991). Elementos de Fotoquímica y de Farmacognosia. Ed. Acribia. España. pp. 55-366
- Borie, F., Fuentealba, R. (1982). Actividad Ureásica. *Agricultura Técnica*, 42 (2). pp. 135-142.
- Cataldo, D., Maroon, M., Schrader, L., & Youngs, V. (1975). Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 6, Estados Unidos pp. 71-80
- Caballero, A. (2008). Temas de Higiene de los Alimentos. Editorial Ciencias Médicas. Habana, Cuba

- Campana, A. (1988). Efecto del Hervido y del Lavado, sobre el Peso, Volumen y Contenido de Alcaloides en el Grano de Tarwi. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Lima, Perú. pp. 303-305.
- Caicedo, C., Murillo, A., Pinzón, J., Peralta, E., & Rivera, M. (2010). INIAP-450 Andino: Variedad de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). Quito, Ecuador.
- Chen, Q. (2004). Determination of phytic acid and inositol pentakis phosphates in foods by high-performance ion chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, pp. 4604-4613.
- Cruz, I. (2013). Antinutrientes: Inhibidores enzimáticos. Recuperado de: <http://www.conasi.eu/blog/consejos-de-salud/inhibidores-enzimaticos/>
- Daub, W., & Seese, W. (1996). Química. 7ma Edición. México. pp. 525.
- Dudley-Cash, W. (2003). Calidad de la harina de soja. Texto recogido de los seminarios de control de calidad de materias primas IV jornadas sobre Control de Calidad de harina de soja y soja integral. *Alimentación Animal*, pp. 56-62
- EFSA. European Food Safety Authority. (2008). Nitrate in vegetables Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. *EFSA Journal*. 689, pp. 1-79
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (1982). El cultivo y la utilización del tarwi: *Lupinus mutabilis* Sweet, *FAO plant production and protection papers*, N° 36, p 236.
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2017). Método rápido potenciométrico para medir actividad ureásica en harina de soya, *FAO plant production and protection papers*. Recuperado de: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB489S/AB489S05.htm>
- FAO/OMS. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud. (2016). Documento de Debate sobre el uso de Nitratos (SIN 251,252) y Nitritos (SIN 249, 250). Recuperado de: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/zh/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-711-49%252FWD%252Ffa49_11s.pdf

- García, P., Garzón, P., Wysocka, W., Maiztegui, B., Alzugaray, M., Del Zotto, H., & Borelli, M. (2004). Quinolozidine alkaloids isolated from *Lupinus* species enhance insulin secretion. *European Journal of Pharmacology*, 504. pp. 139-142. doi: 10.1016/j.ejphar.2004.09.008
- Griffith, D. (1991). Condensed tannins. In: Toxic substances in crop plants. The Royal Society of Chemistry.
- Gavilanes, M. (2003). HACCP para la planta de desamargado de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) y especificaciones de la calidad del grano. (Disertación de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Guerrero, M. (1987). Algunas Propiedades y Aplicaciones de los Alcaloides del Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Quito, Ecuador. pp. 25-28
- García, C. (2013). Inhibidores de Proteasas en Leguminosas. (Disertación de pregrado). Universidad de Valladolid, Valladolid, España.
- Gómez, A. (2013). Selección de un proceso de transformación para la disminución de compuestos antinutricionales en el grano y hojas de amaranto (*Amaranthus caudatus* L.) y sangorache (*Amaranthus hybridus* L.). (Disertación de pregrado). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
- Gurumoorthi, P., Janardhanan, K. y Myhrman, R. (2008). Effect of differential processing methods on L-Dopa and protein quality in velvet bean, an underutilized pulse. *LWT-Food Science and Technology*. 41, pp. 588-596
- Gutiérrez, A., Infantes, M., Pascual, G. y Zamora, J. (2016). Evaluación de los factores en el desamargado de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). *Agroindustrial Science*, 6, Lima, Perú, pp. 145-149.
- Hamerstrand, G., Black, L. & Glover, J. (1981). Trypsin Inhibitors in Soy Products: Modification of the Standard Analytical Procedure. *Cereal Chemistry*. Vol. 58. N° 1, pp. 42-45.

- Hassan, A., Osman, G. y Babiker, E. (2005). Effect of Domestic Processing on Antinutrients and Availability of Protein and Minerals of Lupin (*Lupinus termis*) Seeds. *Journal of Food Technology*. 3 (2). pp. 255-262
- INIAP. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. (2012). Manual Agrícola de Granos Andinos. Publicación Miscelánea N° 69. Quito, Ecuador.
- INIAP. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. (2001). Poscosecha y Mercado de Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) en Ecuador. Publicación Miscelánea N° 105. Quito, Ecuador.
- INIAP. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. (2006). Usos alternativos del chocho. Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) Alimento Andino Redescubierto. Boletín Divulgatorio N° 333. Quito, Ecuador.
- INIAP. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. (2009). Propiedades y aplicaciones de los alcaloides del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). Boletín Técnico N° 133. Quito, Ecuador.
- INIAP. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. (2010). INIAP 451 Guaranguito, nueva variedad de chocho para la provincia de Bolívar. Boletín Divulgatorio N° 382. Quito, Ecuador.
- Jacobsen, S., & Sherwood, S. (2002). Cultivo de Granos Andinos en Ecuador. Ediciones Abaya-Ayala. Quito, Ecuador. p.34
- Jarrín, P. (2003). Tratamientos del Agua de Desamargado del Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). Proveniente de la Planta Piloto de la Estación Santa Catalina INIAP. (Disertación de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador. pp. 62-96.
- Jacobsen, S., & Mujica, A. (2006). El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) y sus parientes silvestres. *Botánica económica de los Andes centrales*. 458-463.
- Kakade, M., Rackis, J., Meghee, J., & Puski, G. (1984). Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: A collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chemistry*, 51, pp. 376-382

- Llorente, J. (2005). Pos y contras de los nitratos. *Discovery DSalud*, 77. Recuperado de: <https://www.dsalud.com/reportaje/pros-contras-de-los-nitratos/>
- López, R. & Ureña, J. (2012). Propiedades antioxidantes de los frutos secos y la disminución del colesterol total y LDL-colesterol. *Revista Costarricense de Salud Pública*. 22 (2).
- Lundberg, J., Weitzberg, E., and Gladwin, M. (2008). The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* 7, 156-167.
- Makkar, H. (2003). Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*, 49 (3). pp. 241-256.
- Martínez, B., Gómez, V. y Rincón, F. (2002). Ácido Fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 52 (3), pp. 219-231.
- Mazza, G. (2000). Alimentos funcionales: Aspectos bioquímicos y de procesado. Editorial Acribia. Zaragoza, España
- Megazyne, 2007. Phytic Acid (phytate)/Total Phosphorus. Assay Procedure. pp. 1-13. Recuperado de: https://secure.megazyne.com/files/Booklet/K-PHYT_DATA.pdf
- Melo, I. y Ligarreto, G. (2010). Contenido de taninos en el grano y características agronómicas en cultivares de frijol común “tipo reventón”. *Agronomía Colombiana*, Vol. 28, N° 2, pp. 147-154
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. (2014). Zonificación Agroecológica Económica del Cultivo de Chocho (*Lupinus mutabilis*) En el Ecuador Continental a escala 1:250.000. Quito, Ecuador
- MicroMas Química y algunas cosas más. (2012). Cinípedos, agalla, taninos y tinta. Recuperado de: <http://www.micromas.net/2012/03/cinipedosagalla-taninos-y-tinta.html>

- Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2390. (2004). Leguminosas grano desamargado de chocho. Requisitos. Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN. Quito, Ecuador
- Novus Nutritio. (2015). Fitatos & Ácido Fítico. Recuperado de: <http://novusnutritio.blogspot.com/2015/05/todo-sobre-los-fitatos-y-el-acido-fitico.html>
- Ortega, E. (2012). Proceso de Fermentación sólida con *Rhizopus oligosporus* para la dexonticación de semillas de lupino (*Lupinus mutabilis*). (Tesis doctoral). Universidad del Valle, Santiago de Cali, Colombia.
- Petterson, D. (2000). The use of lupins in feeding system – Review. *Australian Journal of Animal Science*, 13 (6). pp. 86-88.
- Pérez, S., Niño, Z., Hernández, V., & Hernández, C. (2007). Uso de Enzimas de Tipo Ureasa en el Tratamiento de Aguas Residuales con Alto Contenido en Nitrógeno Orgánico. *Información Tecnológica*.18 (4). pp. 41-48.
- Pariona, P. (2016). Determinación de la actividad ureásica en la harina de soya. (Disertación de pregrado). Universidad Nacional “Daniel Alcides Carrión”, Chanchamayo, Perú.
- Rodríguez, A. (2009). Evaluación “in vitro” de la actividad antimicrobiana de los alcaloides del agua de cocción del proceso de desamargado del chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) (Disertación de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador.
- Román, J., De Arpe, C., Urrialde, R., Fontecha, J., Murcia, M., Gómez, C., y Villarino, A. (2003). Nutrición y Salud: Nuevos alimentos para nuevas necesidades. Nueva Imprenta S.A. Madrid, España
- Sánchez, L., Chávez I., Dorveny, B. Miranda, R. (2008). Toxicidad aguda y subaguda oral del extracto acuoso liofilizado de *Rhizophora mangle* L. en ratas. *Revista Cubana de Plantas medicinales*, 13 (3). Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_asttext&pid=S1028-47962008000300008
- Siavichay, G. (1986). Evaluación Agronómica de Quince Ecotipos de Chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) y Aspectos Relacionados al Mejoramiento

Genético de ésta Especie. (Disertación de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador.

Valle, P., Florentino, B. (2000), Toxicología de Alimentos. Instituto Nacional de Salud Publica Centro Nacional de Salud Ambiental, México, D.F. pp.72

Vázquez, A., Álvarez, E., López, J., Wall-Medrano, A. y De la Rosa, L. (2012). Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. *Tecnociencia Chihuahua*. Vol. 6, México. D.F. pp.84-93.

Villacrés, E., Peralta, E., Cuadrado, L. Revelo, J., Abdo, S., & Aldaz, R. (2009). Propiedades y aplicaciones de los alcaloides del chocho. INIAP, 6. Quito, Ecuador.

Villacreses, N. (2011). Evaluación del procesamiento artesanal del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) sobre el consumo de agua, tiempo empleado y la calidad nutricional y microbiana. (Disertación de pregrado). Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador.

Von Baer, R., Reinerdes, E., & Feldhein, W. (1979). Método titrimétrico. *Unters Forsh* 169. Berlín, Alemania, pp. 27-31

Wink, M. (1992). *Lupinus mutabilis*: composition and potential applications of quinolizidine alkaloids. Comisión de la Comunidad Europea. Luxemburgo, 23, pp. 130.

Zhou, J., & Erdman, J. (1995). Phytic Acid in Health and Disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35 (6), pp. 497-508, doi: 10.1080/10408399509527712

ANEXOS

ANEXO 1. PREPARACIÓN DE REACTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE NITRATOS

REACTIVOS

Ácido salicílico al 5% en ácido sulfúrico

Disolver 5 g. de ácido salicílico en 95 mL de ácido sulfúrico concentrado. Almacenar la botella ámbar y en refrigeración.

Solución estándar de 20 ppm de N-NO_3^-

Disolver 7,233 g de nitrato de potasio KNO_3 seco en estufa a 105 °C por dos horas, en un litro de agua destilada para obtener una solución de 1000 ppm de K. Tomar 20 mL de esta solución y aforar a 1000 mL utilizando sulfato de potasio 0.34 M para llegar a una solución de 20 ppm de N-NO_3 .

Solución extractora K_2SO_4 0.34 M

Pesar 300 g. de K_2SO_4 disolver y llevar a 5 litros utilizando agua destilada.

ANEXO 2. PREPARACIÓN DE REACTIVOS DE LA DETERMINACION DE TANINOS

REACTIVOS

Solución de Folin-Denis

Disolver 100 g de wolframato de sodio deshidratado, 20 g. de ácido fosfomolibdico, 50 mL de ácido fosfórico, en 750 mL de agua destilada. Se calienta por dos horas a reflujo, se enfría y se afora a un litro.

Solución de carbonato de sodio saturado

En 100 mL de agua destilada a 70-80 °C añadir 35 g. de carbonato de sodio anhidro, enfriar y dejar precipitar durante 12 horas; colocar en la solución algunos cristales de carbonato de sodio decahidratado, y luego que se cristaliza filtrar a través de papel filtro.

ANEXO 3. PREPARACION DE REACTIVOS DE LA DETERMINACION DE ALCALOIDES

REACTIVOS

Solución de KOH al 15 %

Disolver 15 g de KOH en 85 mL de agua destilada y aforar a 100mL.

Solución de H₂SO₄ 0.01N

Tomar 0.053 mL de H₂SO₄ concentrado y disolver con 95 mL de agua destilada y aforar a 200 mL.

.

Solución de NaOH 0.01 N

Pesar 0.08 g de NaOH y disolver con 150 mL de agua destilada y aforar a 200 mL.

ANEXO 4. PREPARACIÓN DE REACTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD UREASA

REACTIVOS

Buffer fosfato 0.05 M

Disolver 3,403 g de KH₂PO₄ en aproximadamente 100mL de agua destilada. Disolver 4,355 g de K₂HPO₄ en aproximadamente 100 mL de agua

destilada. Combinar las 2 soluciones y aforar a 1000 mL. Ajustar el pH de la solución a 7.0 con una solución fuertemente ácida o básica antes de usar.

Solución bufferizada de urea

Disolver 15 g de urea en 500 mL de Buffer fosfato. Añadir 5 mL de tolueno como un preservante y para prevenir la formación de mohos. Ajustar el pH a 7.0.

ANEXO 5. PREPARACIÓN DE REACTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO FÍTICO

REACTIVOS DEL KIT

Botella 1

Buffer de acetato de sodio (25 mL; pH 5,5), azida de sodio (0,02 % p/v) como preservante. Estable por 2 años a 4 °C (Denominada Solución 1).

Botella 2

Suspensión de fitasa (1,2 mL). Estable por 2 años a 4 °C (Denominada Suspensión 2).

Botella 3

Buffer de glicina (25 mL; pH 10,4), mas $MgCl_2$, $ZnSO_4$ y azida de sodio (0,02 % p/v) como conservante. Estable durante más de 2 años a 4 °C (Denominada Solución 2).

Botella 4

Suspensión de fosfatasa alcalina (1,2 mL). Estable durante 2 años a 4 °C (Denominada Suspensión 4).

Botella 5

Solución estándar de fósforo (24 mL; 50 ug/mL) y azida de sodio (0.02 % p/v) como conservante. Estable durante más de 2 años a 4 °C.

Botella 6

Harina de avena, polvo control. Estable por 5 años a temperatura ambiente.

REACTIVOS ADICIONALES

Solución A. Ácido ascórbico (10 % p/v) / Ácido sulfúrico (1M): 100 mL

Añadir 10 g de ácido ascórbico (Sigma cat. No 95210) a 10 mL de agua destilada. Añadir 5,35 mL de ácido sulfúrico concentrado (Sigma cat. No 84718) y disolver el ácido ascórbico. Aforar la solución a 100 mL con agua destilada.

Solución B. Molibdato de amonio (5 % p/v): 25 mL

Añadir 1,25 g de molibdato de amonio (Sigma cat. No 31403) a 20 mL de agua destilada y disolver. Aforar con agua destilada a 25 mL.

Solución AB

Mezclar una parte de la solución B con 5 partes de la solución A. Preparar esta solución el día de su utilización.

Ácido tricloroacético (50 % p/v): 100 mL

Añadir 50 g de ácido tricloroacético (Sigma cat. No 33731) a 60 mL de agua destilada y disolver. Aforar con agua destilada a 100 mL. Almacenar la solución a 4 °C.

Ácido clorhídrico (0,66 M): 1 litro

Añadir 54,5 mL de ácido clorhídrico (Sigma cat. No 1.00317.2500) a 954,5 mL de agua destilada y mezclar.

Hidróxido de sodio (0,75 M): 200 mL

Añadir 6 g de hidróxido de sodio (Merck cat. No 1.06482.5000) a 180 mL de agua destilada. Aforar con agua destilada a 200 mL.

ANEXO 6. PREPARACIÓN DE REACTIVOS DE LA DETERMINACIÓN DE INHIBIDORES DE TRIPSINA

REACTIVOS

Solución de Tris-Buffer

Disolver 1,21 g de Tris (hidroxymethyl) aminomethane y 0,59 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 180 mL de agua destilada, el pH se ajusta hasta 8,2 y se afora a 200 mL con agua destilada. Esta solución se precalienta a 37 °C para la formulación de BAPA.

Solución de BAPA

Disolver 0,080 g de BAPA en 2 mL de DMSO (Dimetil sulfóxido) y se lleva a 200 mL con la solución de Tris-Buffer. Esta solución es estable 4 horas.

Solución de Tripsina

Disolver 0,0040 g de tripsina en 200 mL de HCL 0,001 N. se conserva en refrigeración de 5-10 °C.

Solución de Ácido acético al 30%

Diluir 30 mL de ácido acético 100% glacial en 95 mL de agua destilada y aforar a 100 mL.

ANEXO 7. RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS EJECUTADOS PARA LOS ANTINUTRINETES EN LAS TRES VARIEDADES DE CHOCHO

NITRATOS

Muestra	Pesos (g)	Abs 410 nm	C. Final (mg/L)	C. Inicial (mg/L)	C. Final/ Inicial * 100	mg/100g (Base seca)	mg/kg
AMARGO							
450	2,507	0,323	8,578	2,507E+05	0,0034	37,134	371,341
450	2,502	0,321	8,526	2,502E+05	0,0034	36,984	369,835
450	2,505	0,31	8,241	2,505E+05	0,0033	35,705	357,046
451	2,508	0,355	9,407	2,508E+05	0,0038	41,203	412,033
451	2,509	0,343	9,096	2,509E+05	0,0036	39,826	398,257
451	2,508	0,352	9,329	2,508E+05	0,0037	40,863	408,628
Criollo	2,505	0,317	8,422	2,505E+05	0,0034	36,544	365,435
Criollo	2,502	0,333	8,837	2,502E+05	0,0035	38,388	383,880
Criollo	2,505	0,339	8,992	2,505E+05	0,0036	39,016	390,165
DESAMARAGADO							
450	2,508	0,17	4,614	2,508E+05	0,0018	1,893	18,935
450	2,507	0,171	4,640	2,507E+05	0,0019	1,905	19,049
450	2,507	0,168	4,562	2,507E+05	0,0018	1,873	18,730
451	2,509	0,248	6,635	2,509E+05	0,0026	2,843	28,426
451	2,507	0,252	6,738	2,507E+05	0,0027	2,889	28,893
451	2,507	0,249	6,661	2,507E+05	0,0027	2,856	28,560
Criollo	2,503	0,199	5,365	2,503E+05	0,0021	2,226	22,262
Criollo	2,506	0,191	5,158	2,506E+05	0,0021	2,138	21,377
Criollo	2,506	0,195	5,262	2,506E+05	0,0021	2,181	21,806

FERMENTADO							
450	2,510	0,140	3,837	2,510E+05	0,0015	1,660	16,597
450	2,506	0,113	3,137	2,506E+05	0,0013	1,359	13,593
450	2,508	0,117	3,241	2,508E+05	0,0013	1,403	14,031
451	2,504	0,237	6,350	2,504E+05	0,0025	2,880	28,800
451	2,501	0,233	6,246	2,501E+05	0,0025	2,836	28,364
451	2,504	0,207	5,573	2,504E+05	0,0022	2,527	25,275
Criollo	2,507	0,184	4,977	2,507E+05	0,0020	2,188	21,883
Criollo	2,504	0,18	4,873	2,504E+05	0,0019	2,145	21,452
Criollo	2,504	0,182	4,925	2,504E+05	0,0020	2,168	21,680

TANINOS

Muestra	Pesos (g)	Abs 680 nm	Concentración (mg/L)	mg/100g (Base seca)	%
AMARGO					
450	1,003	0,322	4,671	931,387	1,014
450	1,002	0,333	4,826	963,328	1,048
450	1,002	0,33	4,784	954,870	1,038
451	1,004	0,32	4,643	924,832	1,020
451	1,005	0,31	4,501	895,803	0,989
451	1,004	0,317	4,600	916,391	1,011
Criollo	1,002	0,353	5,109	1019,712	1,111
Criollo	1,003	0,331	4,798	956,734	1,043
Criollo	1,002	0,352	5,095	1016,893	1,107
DESAMARGADO					
450	1,006	0,047	0,787	156,406	0,162
450	1,005	0,046	0,773	153,751	0,159
450	1,005	0,046	0,773	153,751	0,159
451	1,004	0,06	0,970	193,295	0,209
451	1,007	0,061	0,984	195,524	0,212
451	1,005	0,059	0,956	190,291	0,206
Criollo	1,004	0,063	1,013	201,735	0,210
Criollo	1,005	0,064	1,027	204,346	0,213
Criollo	1,004	0,065	1,041	207,363	0,216

FERMENTADO					
450	1,007	0,042	0,716	142,225	0,156
450	1,002	0,041	0,702	140,115	0,152
450	1,004	0,045	0,758	151,091	0,165
451	1,009	0,055	0,900	178,338	0,205
451	1,008	0,055	0,900	178,515	0,205
451	1,008	0,056	0,914	181,318	0,208
Criollo	1,009	0,058	0,942	186,737	0,208
Criollo	1,009	0,058	0,942	186,737	0,208
Criollo	1,008	0,057	0,928	184,120	0,205

ALCALOIDES

Muestra	Pesos (g)	Volumen Blanco (mL)	Volumen Exacto (mL)	% (Base Seca)
AMARGO				
450	0,230	5,25	7,65	3,700
450	0,201	5,25	7,35	3,761
450	0,202	5,25	7,50	3,830
451	0,204	5,25	8,85	4,556
451	0,210	5,25	8,75	4,452
451	0,213	5,25	8,70	4,400
Criollo	0,201	5,25	7,60	3,894
Criollo	0,202	5,25	7,25	3,708
Criollo	0,207	5,25	7,15	3,620
DESAMARGADO				
450	0,202	1,25	0,55	0,282
450	0,203	1,25	0,60	0,308
450	0,204	1,25	0,60	0,307
451	0,204	1,25	0,65	0,347
451	0,205	1,25	0,65	0,347
451	0,209	1,25	0,65	0,344
Criollo	0,204	1,25	0,60	0,310
Criollo	0,206	1,25	0,65	0,334
Criollo	0,202	1,25	0,60	0,311
FERMENTADO				
450	0,203	4,45	0,20	0,298
450	0,214	4,45	0,20	0,283
450	0,203	4,45	0,15	0,224
451	0,206	4,45	0,20	0,307

451	0,202	4,45	0,15	0,235
451	0,201	4,45	0,20	0,315
Criollo	0,203	4,45	0,15	0,227
Criollo	0,201	4,45	0,10	0,153
Criollo	0,203	4,45	0,10	0,151

ACTIVIDAD UREÁSICA

Muestra	Blanco pH	pH	Δ pH
AMARGO			
450	6,74	7.38	0.64
450	6,74	7.39	0.65
450	6,74	7.36	0.62
451	6,78	7.51	0.73
451	6,78	7.49	0.71
451	6,78	7.50	0.72
Criollo	6,74	7.32	0.58
Criollo	6,74	7.30	0.56
Criollo	6,74	7.34	0.60
DESAMARGADO			
450	6.87	6.94	0.07
450	6.87	6.93	0.06
450	6.87	6.94	0.07
451	6.83	6.92	0.09
451	6.83	6.92	0.09
451	6.83	6.90	0.07
Criollo	6.86	6.93	0.07
Criollo	6.86	6.94	0.08
Criollo	6.86	6.93	0.07
FERMENTADO			
450	6.84	6.89	0.05
450	6.84	6.90	0.06
450	6.84	6.89	0.05
451	6.84	6.90	0.06
451	6.84	6.90	0.06
451	6.84	6.89	0.05
Criollo	6.91	6.97	0.06
Criollo	6.91	6.97	0.06
Criollo	6.91	6.98	0.07

ÁCIDO FÍTICO

Muestra	Peso (g)	Fósforo libre	Fósforo Total	Δ Abs (Fósforo)	Fósforo (g/100g)	Á. fítico (g/100g) Base seca
AMARGO						
450	1,002	0,102	0,213	0,111	0,063	0,243
450	1,008	0,098	0,218	0,120	0,068	0,262
450	1,005	0,111	0,219	0,108	0,061	0,236
451	1,009	0,167	0,311	0,144	0,081	0,317
451	1,007	0,154	0,275	0,121	0,068	0,267
451	1,008	0,163	0,301	0,138	0,078	0,305
Criollo	1,005	0,169	0,345	0,176	0,100	0,385
Criollo	1,005	0,164	0,339	0,175	0,099	0,383
Criollo	1,003	0,165	0,337	0,172	0,097	0,407
DESAMARGADO						
450	1,005	0,041	0,111	0,070	0,039	0,145
450	1,004	0,053	0,111	0,058	0,033	0,120
450	1,005	0,047	0,103	0,056	0,031	0,116
451	1,006	0,051	0,124	0,073	0,041	0,157
451	1,002	0,047	0,122	0,075	0,042	0,162
451	1,004	0,048	0,122	0,074	0,042	0,160
Criollo	1,006	0,049	0,106	0,057	0,032	0,119
Criollo	1,004	0,044	0,115	0,071	0,040	0,148
Criollo	1,005	0,046	0,104	0,058	0,032	0,121
FERMENTADO						
450	1,005	0,159	0,190	0,031	0,017	0,067
450	1,007	0,159	0,189	0,030	0,017	0,065
450	1,006	0,162	0,201	0,039	0,022	0,085
451	1,007	0,183	0,232	0,049	0,027	0,111
451	1,004	0,184	0,245	0,061	0,034	0,139
451	1,005	0,184	0,240	0,056	0,031	0,128
Criollo	1,005	0,159	0,195	0,036	0,020	0,079
Criollo	1,006	0,167	0,191	0,024	0,013	0,053
Criollo	1,005	0,166	0,192	0,026	0,014	0,057

INHIBIDORES DE TRIPSINA

Muestra	Peso (g)	Abs. Estandar	Abs. Medida	Abs. Blanco	Abs. Medida real	AI (Diferencia de absorbancias)	TIA mg/g
AMARAGO							
450	1,007	1,405	1,191	0,394	0,797	0,608	0,794
450	1,005	1,405	1,19	0,394	0,796	0,609	0,797
450	1,002	1,405	1,207	0,394	0,813	0,592	0,777
451	1,003	1,405	1,138	0,468	0,67	0,735	0,964
451	1,006	1,405	1,128	0,468	0,66	0,745	0,974
451	1,003	1,405	1,135	0,468	0,667	0,738	0,968
Criollo	1,007	1,405	1,079	0,307	0,772	0,633	0,827
Criollo	1,002	1,405	1,088	0,307	0,781	0,624	0,819
Criollo	1,007	1,405	1,084	0,307	0,777	0,628	0,821
DESAMARAGDO							
450	1,005	1,405	1,352	0,125	1,227	0,178	0,233
450	1,003	1,405	1,362	0,125	1,237	0,168	0,220
450	1,004	1,405	1,364	0,125	1,239	0,166	0,218
451	1,011	1,405	1,356	0,144	1,212	0,193	0,251
451	1,010	1,405	1,357	0,144	1,213	0,192	0,250
451	1,008	1,405	1,344	0,144	1,2	0,205	0,268
Criollo	1,005	1,405	1,325	0,111	1,214	0,191	0,250
Criollo	1,003	1,405	1,325	0,111	1,214	0,191	0,251
Criollo	1,009	1,405	1,328	0,111	1,217	0,188	0,245
FERMENTADO							
450	1,055	1,405	1,294	0,016	1,278	0,127	0,158
450	1,045	1,405	1,275	0,016	1,259	0,146	0,184
450	1,007	1,405	1,295	0,016	1,279	0,126	0,165
451	1,030	1,405	1,247	0,025	1,222	0,183	0,234
451	1,010	1,405	1,243	0,025	1,218	0,187	0,244
451	1,007	1,405	1,246	0,025	1,221	0,184	0,240
Criollo	1,005	1,405	1,267	0,015	1,252	0,153	0,200
Criollo	1,008	1,405	1,274	0,015	1,259	0,146	0,191
Criollo	1,006	1,405	1,275	0,015	1,26	0,145	0,190

ANEXO 8. ANÁLISIS DE LA VARIANZA Y PRUEBA TUKEY AL 5% PARA LOS ANTINUTRINETES EN LAS TRES VARIEDADES DE CHOCHO.

NITRATOS

Variable N R² R² Aj CV
Nitratos 27 1,00 1,00 4,12

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	8332,54	8	1041,57	3293,28	<0,0001
Variedad	11,80	2	5,90	18,65	<0,0001
Condición	8305,70	2	4152,85	13130,70	<0,0001
Variedad*Condición	15,05	4	3,76	11,89	0,0001
Error	5,69	18	0,32		
<u>Total</u>	<u>8338,24</u>	<u>26</u>			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,67660

Error: 0,3163 gl: 18

Variedad Medias n E.E.

451 14,54 9 0,19 A
 Cr 13,39 9 0,19 B
450 12,97 9 0,19 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,67660

Error: 0,3163 gl: 18

Condición Medias n E.E.

AMG 38,41 9 0,19 A
 DES 2,31 9 0,19 B
FER 0,18 9 0,19 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,60891

Error: 0,3163 gl: 18

Variedad Condición Medias n E.E.

451	AMG	40,63	3	0,32	A
Cr	AMG	37,98	3	0,32	B
450	AMG	36,61	3	0,32	B
451	DES	2,86	3	0,32	C
Cr	DES	2,18	3	0,32	C
450	DES	1,89	3	0,32	C D
450	FER	0,42	3	0,32	D E
451	FER	0,11	3	0,32	E
Cr	FER	0,01	3	0,32	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

TANINOS

Variable N R² R² Aj CV

Taninos 27 1,00 1,00 3,72

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	5,52	8	0,69	2913,41	<0,0001
Variedad	0,01	2	3,4E-03	14,31	0,0002
Condición	5,50	2	2,75	11621,35	<0,0001
Variedad*Condición	0,01	4	2,1E-03	8,99	0,0004
Error	4,3E-03	18	2,4E-04		
Total	5,52	26			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,01851

Error: 0,0002 gl: 18

Variedad Medias n E.E.

Cr	0,44	9	0,01	A
451	0,41	9	0,01	B
450	0,40	9	0,01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,01851

Error: 0,0002 gl: 18

Condición Medias n E.E.

AMG 1,04 9 0,01 A

DES 0,19 9 0,01 B

FER 3,8E-03 9 0,01 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,04402

Error: 0,0002 gl: 18

Variedad Condición Medias n E.E.

Cr AMG 1,09 3 0,01 A

450 AMG 1,03 3 0,01 B

451 AMG 1,01 3 0,01 B

Cr DES 0,21 3 0,01 C

451 DES 0,21 3 0,01 C

450 DES 0,16 3 0,01 D

Cr FER 0,01 3 0,01 E

451 FER 3,0E-03 3 0,01 E

450 FER 2,3E-03 3 0,01 E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ALCALOIDES

Variable N R² R² Aj CV

Alcaloides 27 1,00 1,00 4,42

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	87,59	8	10,95	2615,07	<0,0001
Variedad	0,36	2	0,18	42,97	<0,0001
Condición	86,54	2	43,27	10334,58	<0,0001
Variedad*Condición	0,69	4	0,17	41,36	<0,0001

Error	0,08 18 4,2E-03
Total	<u>87,67 26</u>

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,07785

Error: 0,0042 gl: 18

Variedad Medias n E.E.

451	1,63	9	0,02	A
Cr	1,40	9	0,02	B
450	1,36	9	0,02	<u>B</u>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,07785

Error: 0,0042 gl: 18

Condición Medias n E.E.

AMG	3,99	9	0,02	A
DES	0,32	9	0,02	B
FER	0,08	9	0,02	<u>C</u>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,18512

Error: 0,0042 gl: 18

Variedad Condición Medias n E.E.

451	AMG	4,47	3	0,04	A
450	AMG	3,76	3	0,04	B
Cr	AMG	3,74	3	0,04	B
451	DES	0,35	3	0,04	C
Cr	DES	0,32	3	0,04	C D
450	DES	0,30	3	0,04	C D
Cr	FER	0,14	3	0,04	D E
451	FER	0,06	3	0,04	E
450	FER	0,03	3	0,04	<u>E</u>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ACTIVIDAD UREÁSICA

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
Actividad Ureásica	27	1,00	1,00	4,13

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	2,05	8	0,26	2227,63	<0,0001
Variedad	0,01	2	0,01	47,65	<0,0001
Condición	2,02	2	1,01	8778,42	<0,0001
Variedad*Condición	0,02	4	4,8E-03	42,23	<0,0001
Error	2,1E-03	18	1,1E-04		
Total	2,05	26			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,01289

Error: 0,0001 gl: 18

Variedad Medias n E.E.

451	0,29	9	3,6E-03	A
450	0,25	9	3,6E-03	B
Cr	0,24	9	3,6E-03	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,01289

Error: 0,0001 gl: 18

Condición Medias n E.E.

AMG	0,65	9	3,6E-03	A
DES	0,07	9	3,6E-03	B
FER	0,06	9	3,6E-03	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,03065

Error: 0,0001 gl: 18

Variedad Condición Medias n E.E.

451	AMG	0,72	3	0,01	A
-----	-----	------	---	------	---

450	AMG	0,64	3	0,01	B
Cr	AMG	0,58	3	0,01	C
451	DES	0,08	3	0,01	D
Cr	DES	0,07	3	0,01	D
450	DES	0,07	3	0,01	D
Cr	FER	0,06	3	0,01	D
451	FER	0,06	3	0,01	D
450	FER	0,05	3	0,01	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ÁCIDO FÍTICO

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
Ácido Fítico	27	0,98	0,98	11,01

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	0,35	8	0,04	129,55	<0,0001
Variedad	0,01	2	0,01	19,01	<0,0001
Condición	0,32	2	0,16	464,96	<0,0001
Variedad*Condición	0,02	4	0,01	17,12	<0,0001
Error	0,01	18	3,4E-04		
Total	0,36	26			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,02216

Error: 0,0003 gl: 18

Variedad Medias n E.E.

Cr	0,20	9	0,01	A
451	0,16	9	0,01	B
450	0,14	9	0,01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,02216

Error: 0,0003 gl: 18

Condición Medias n E.E.

AMG	0,31	9	0,01	A
DES	0,14	9	0,01	B
FER	0,05	9	0,01	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,05270

Error: 0,0003 gl: 18

Variedad Condición Medias n E.E.

Cr	AMG	0,39	3	0,01	A
451	AMG	0,30	3	0,01	B
450	AMG	0,25	3	0,01	B
451	DES	0,16	3	0,01	C
Cr	DES	0,13	3	0,01	C
450	DES	0,13	3	0,01	C
Cr	FER	0,07	3	0,01	D
450	FER	0,05	3	0,01	D
451	FER	0,03	3	0,01	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

INHIBIDORES DE TRIPSINA

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
Inhibidores de Tripsina	27	1,00	1,00	2,57

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	3,33	8	0,42	4323,99	<0,0001
Variedad	0,02	2	0,01	81,81	<0,0001
Condición	3,27	2	1,64	16988,07	<0,0001
Variedad*Condición	0,04	4	0,01	113,04	<0,0001
Error	1,7E-03	18	9,6E-05		
Total	3,33	26			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,01180*Error: 0,0001 gl: 18*Variedad Medias n E.E.

451 0,41 9 3,3E-03 A

Cr 0,38 9 3,3E-03 B

450 0,36 9 3,3E-03 C*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)***Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,01180***Error: 0,0001 gl: 18*Condición Medias n E.E.

AMG 0,86 9 3,3E-03 A

DES 0,24 9 3,3E-03 B

FER 0,04 9 3,3E-03 C*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)***Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,02807***Error: 0,0001 gl: 18*Variedad Condición Medias n E.E.

451 AMG 0,97 3 0,01 A

Cr AMG 0,82 3 0,01 B

450 AMG 0,79 3 0,01 C

451 DES 0,26 3 0,01 D

Cr DES 0,25 3 0,01 D E

450 DES 0,22 3 0,01 E

Cr FER 0,05 3 0,01 F

450 FER 0,05 3 0,01 F

451 FER 0,02 3 0,01 G*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)*

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Edgar Esteban Fernández Cheza, con CC. 1722659990, autor del trabajo de graduación titulado: “Determinación de contenido de antinutrientes en tres variedades de chocho (Andino INIAP 450, Guaranguito INIAP 451 y Criollo)”, previo la obtención del grado académico de LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS CON MENCIÓN EN QUÍMICA ANALÍTICA en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos del autor.

2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido Trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 20 de diciembre de 2017

Edgar Esteban Fernández Cheza
CC. 1722659990